



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TURUNÇGİL ve AVOKADO'DA GÖRÜLEN ANTRAKNOZ HASTALIK
ETMENİ *Colletotrichum karstii*'YE KARŞI ANTAGONİST BAKTERİ
İZOLATLARI ve BİTKİ UÇUCU YAĞLARININ ANTİFUNGAL
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

KÜBRA GÜLOĞLU

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
EYLÜL-2022**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TURUNÇGİL ve AVOKADO'DA GÖRÜLEN ANTRAKNOZ HASTALIK
ETMENİ *Colletotrichum karstii*'YE KARŞI ANTAGONİST BAKTERİ
İZOLATLARI ve BİTKİ UÇUCU YAĞLARININ ANTİFUNGAL
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

KÜBRA GÜLOĞLU
ORCID:0000-0003-0665-5350

BİTKİ KORUMAANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANSTEZİ

Danışman
Prof. Dr. SONER SOYLU
ORCID:0000-0003-1002-8958

HATAY
EYLÜL-2022

08/09/2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

KÜBRA GÜLOĞLU

ÖZET

TURUNÇGİL ve AVOKADO'DA GÖRÜLEN ANTRAKNOZ HASTALIK ETMENİ *Colletotrichum karstii*'YE KARŞI ANTAGONİST BAKTERİ İZOLATLARI ve BİTKİ UÇUCU YAĞLARININ ANTİFUNGAL ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Colletotrichum karstii Hatay ilinde yetişen turunçgil ve avokado ağaçlarında Antraknoz hastalık etmeni olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada, sağlıklı turunçgil ve avokado ağaçlarının yaprak, sürgün, meyve ve köklerinden izole edilen antagonist bakteri izolatları ile tıbbi öneme sahip bitkilerden elde edilen uçucu yağlarının *Colletotrichum karstii*'ye karşı *in vitro* antifungal etkinlikleri belirlenmiştir. Yapılan GC-MS analizler sonucunda, carvacrol bileşeni *Thymbra spicata* var. *spicata* (Tss) ve *Origanum syriacum* (Os), thymol bileşeni *Thymus serpyllum* (Tsy), terpinen-4-ol bileşeni *Origanum majorana* (Om), trans-anethole bileşeni *Foeniculum vulgare* (Fv), eucalyptol bileşeni *Eucalytus camadulensis* (Ec), linalool bileşeni *Mentha x piperita* f.sp. *officinalis* var. 'Aura' (Ma), α -pinene bileşeni *Ferula communis* (Fc), limonene bileşeni ise *Lippia citridora* (Lc) ve *Citrus aurantium* (Ca) uçucu yağlarının ana bileşenleri olarak belirlenmiştir. Test edilen uygulamalar arasında Tss, Os, Tsy, Fv, Lc, Ma ve Om uçucu yağları 4.0-20.0 μ l/petri dozlarında fungal etmenin misel gelişimini %100 engellemek suretiyle en yüksek antifungal etkinlik gösteren uçucu yağlar olarak belirlenmiştir. Ec ve Ca uçucu yağları diğer yağlara kıyasla nispeten düşük antifungal etkinlik göstermiş (>50 μ l/petri dozlarında), Fc ise test edilen tüm dozlarda misel gelişimini engellemede başarılı olamamıştır.

Sağlıklı ağaçların rizosfer ve endosfer bölgelerinden elde edilen 70 bakteri izolatu arasında seçilmiş 50 izolat MALDI-TOF MS ile teşhis edilmiş ve fungal etmenin misel gelişimini engellenme (antagonizm) potansiyelleri karakterize edilmiştir. *In vitro* ikili kültür testlerinde, *Bacillus mojavensis* KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep, *Bacillus atrophaeus* KGT7en, *Bacillus cereus* KGT13enve *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep izolatları *C. karstii*'nin misel gelişimini yaklaşık %72-83 oranlarında engelleyen en etkili antagonist bakteri izolatları olarak belirlenmiştir. Test edilen bakteri izolatları siderofor, proteaz, hidrojen siyanür (HCN), amonyak üretiminin yanısıra bitki gelişimini teşvik eden (PGP) indole-3-asetik asit (IAA), fosfor çözme etkinlikleri bakımından istatistiksel olarak farklılıklar göstermiştir. Fungal etmenin misel gelişiminin engellenmesinde siderofor, proteaz, hidrojen siyanür ve amonyak üretimi gibi antagonistik mekanizmalardan bir veya birkaçının rol oynadığı belirlenmiştir. Seçilerek test edilen 29 bakteri izolatu tamamı besi yerinde değişen oranlarda IAA üretmiş olup, 15 izolat tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri üzerinde fosforu çözebilme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak güçlü antagonistik (siderofor, proteaz, amonyak üretimi) ve PGP (IAA ve fosfor çözme) etkinlikleri gösteren, *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp. izolatlarının turunçgil ve avokado ağaçlarında antraknoz hastalığına karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma antagonist bakteri türlerinin turunçgil ve avokado antraknoz hastalık etmeni *C. karstii*'ye karşı biyokontrol etkinliğinin ve etki mekanizmalarının araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

2022, 104 sayfa

Anahtar kelimeler: Turunçgil, avokado, *Colletotrichum karstii*, uçucu yağlar, Biyolojik mücadele

ABSTRACT

DETERMINATION of ANTIFUNGAL EFFICIENCIES of ANTAGONIST BACTERIAL ISOLATES and PLANT ESSENTIAL OILS AGAINST CITRUS and AVOCADO ANTHRACNOSE DISEASE AGENT *Colletotrichum karstii*

Colletotrichum karstii has been recently reported as an anthracnose disease agent on citrus and avocado trees growing in Hatay province. In this study, *in vitro* antifungal efficiencies of antagonist bacterial isolates, which were isolated and identified from leaves, shoots, fruits and roots of healthy citrus and avocado trees, and essential oils of medically important plants were investigated against *Colletotrichum karstii*. As a result of GC-MS analysis, the major constituents of the essential oils were determined as carvacrol in *Thymbra spicata* var. *spicata* (Tss) and *Origanum syriacum* (Os), terpinen-4-ol in *Origanum majorana* (Om), trans-anethole in *Foeniculum vulgare* (Fv), eucalyptol in *Eucalytus camadulensis* (Ec), linalool in *Mentha x piperita* f.sp. *officinalis* var. 'Aura' (Ma), α -pinene in *Ferula communis* (Fc), limonene in *Lippia citridora* (Lc) and *Citrus aurantium* (Ca) essential oils respectively. Among the tested essential oils, Tss, Os, Tsy, Fv, Lc, Ma and Om essential oils were determined as the most effective essential oils by completely (100%) inhibiting mycelial growth (MIC) at the concentrations of 4.0-20.0 μ l/petri. Essential oils of Ec and Ca plants were determined as the least effective essential oils comparison to all essential oils (MIC at >50 μ l/petri concentrations). Fc, on the other hand, was not successful in inhibiting mycelial growth at all concentrations tested.

Among 70 bacterial isolates, obtained from the rhizosphere and endosphere of healthy trees, 50 isolates were selected to determine antagonistic potential against fungal isolates and identified by MALDI-TOF MS analysis. According to results of *in vitro* dual culture assay, *Bacillus mojavensis* KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep, *Bacillus atrophaeus* KGT7en, *Bacillus cereus* KGT13en, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep isolates were found as the most effective antagonistic bacterial isolates inhibiting mycelial growth of *Colletotrichum karstii* by 72-83 %. Bacterial isolates show significantly varied as statistically in the production of siderophore, protease, hydrogen cyanate (HCN), ammonia and plant growth promoting (PGP) mechanisms such as indole 3 acetic acid (IAA) and phosphate solubilisation activities. It has been determined that one or more of the antagonistic mechanisms such as siderophore, protease, HCN and ammonia production are the factor(s) playing a role in the suppression of mycelial growth of the fungal agent. Twenty nine selected bacterial isolates produced varying amounts of IAA in nutrient media. Among 29 tested isolates, fifteen isolates has the ability to dissolve phosphorus from tri calcium phosphate on Pikovskaya Agar (PVK) petri plates.

In conclusion, showing the potent antagonistic (siderophore, protease, ammonium production) and PGP (IAA and phosphate solubilization potentials) activities, bacterial isolates belonging to *Bacillus* spp and *Pseudomonas* spp., have the potential to be used as biological control agent against anthracnose disease. This is the first study which investigates the biocontrol efficiencies and mechanisms of action of antagonist bacterial species against citrus and avocado anthracnose disease agent *Colletotrichum karstii*.

2022, 104 pages

Keywords: Citrus, avocado, *Colletotrichum karstii*, essential oils, biological control

TEŞEKKÜR

Tez çalışması döneminde yanımda olan, yön gösteren,yol açan her aşamasında bilgilendirme ve açıklama yapan tecrübelerinden faydalandıran; bu süreçte iyi niyeti, samimi ve etik davranışları ile yardımcı olan değer verdiğim danışmam hocam Prof. Dr. Soner SOYLU'ya aynı zamanda bölümde bulunan bilgilerini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. E. Mine SOYLU, Prof. Dr. Şener KURT'a, tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm imkânlarından yararlanmamı sağlayan HMKÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na, maddi destek veren HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve FBE yönetimine teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuarda izolatların ve *in vitro* etkinliğinin belirlenmesinde yardımcı olan Ar.Gör. Dr. Merve KARA ve Öğr.Gör. Dr. Aysun UYSAL bitki uçucu yağların çıkarılması ve analizindeki yardımından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Musa TÜRKMEN'e yüksek lisans yapmaya yönlendiren Zir. Yük. Müh. Şahimerdan TÜRKÖLMEZ'e, teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren motivasyonları, enerjileri, yapacağıma inançları ile yanımda olan maddi, manevi desteklediğini her zaman hissettiğim annem Şengül GÜLOĞLU, babam Remzi GÜLOĞLU'a ve arkamda gizli kahraman gibi görünmeden yardımcı olan geniş aileme, hem arkadaşım hemde laboratuarda yardımcı olan güzel insan Ar.Gör. Yusuf GÜMÜŞ'e diğer arkadaşlarım Mariye DAĞ, Büşra ÖZDEMİR ve Nudem KUŞTOĞAN'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	12
2.1. Hastalık Etmeni <i>C. karstii</i> 'nin Dünya ve Ülkemiz Genelindeki Durumu ile İlgili Çalışmalar	12
2.2. Antraknoz Hastalık Etmenleri (<i>Colletotrichum</i> spp.) ile Kimyasallara Alternatif Mücadele Konusunda Yapılan Çalışmalar	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	33
3.1. Materyal.....	33
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Bitki Uçucu Yağları, Kimyasal Bileşenleri ve <i>Colletotrichumkarstii</i> 'ye Karşı <i>in vitro</i> Antifungal Etkilerinin Belirlenmesi	33
3.2.1.1. Bitki Uçucu Yağların Elde Edilmesi.....	33
3.2.1.2. Bitki Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenlerinin GC/MS ile Belirlenmesi	34
3.2.1.3. Bitki Uçucu Yağların <i>Colletotrichumkarstii</i> 'ye Karşı <i>in vitro</i> Antifungal Etkilerinin Belirlenmesi	34
3.2.1.4. Bitki Uçucu Yağların <i>Colletotrichumkarstii</i> 'nin Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Etkinliğinin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi	35
3.2.1.5. Bitki Uçucu Yağlarının Fungus Hif Yapılarında Sebep Olduğu Morfolojik Değişiklerin Belirlenmesi.....	36
3.2.2. Antagonist Bakteri İzolatları <i>Colletotrichumkarstii</i> 'ye Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinlikleri, Antagonistik ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi	37
3.2.2.1. Epifitik ve Endofitik Antagonist Bakterilerin İzolasyonu	37
3.2.2.2. Antagonist Bakteri İzolatların Biyo-Etkinlik Çalışmaları İçin Seçimi	40
3.2.2.3. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Tanımlanması	42
3.2.2.4. Antagonist Bakteri İzolatların <i>C. karstii</i> 'nin Misel Gelişiminin Engellenmesi Üzerine <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi	43
3.2.2.5. Antagonist Bakteri İzolatların Fungal Etmenin Misel ve Sporları Üzerine Olan Antifungal Özelliklerinin Belirlenmesi	44
3.2.2.6. Antagonist Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin Misel Gelişimi üzerine Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi	46
3.2.2.7. Antagonist Bakteri izolatlarının Siderofor ve Proteaz Üretme Potansiyelleri ile Fosforu Çözme Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	47
3.2.2.8. Antagonist Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	49
3.2.2.9. Antagonist Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH ₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	49

3.2.2.10. Antagonist Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	50
3.2.3. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	52
4.1. Bitki Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenleri	52
4.2. Bitki Uçucu Yağların Fungal Etmenin Misel Gelişiminin Engellenmesi Üzerine <i>in vitro</i> Antifungal Etkilerinin Belirlenmesi	54
4.3. Bitki Uçucu Yağlarının Fungus Misel ve Hif Yapılarında Meydana Getirdiği Morfolojik Değişiklerin Belirlenmesi	59
4.4. Antagonist Bakteri İzolatların <i>C. karstii</i> 'ye Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinlikleri, Antagonistik ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi ..	61
4.4.1. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının İzolasyonu ve Tanılanması	61
4.4.2. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının <i>C. karstii</i> 'nin Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine Antagonistik Etkinliklerinin <i>in vitro</i> Koşullarda Belirlenmesi	65
4.4.3. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişiminin Engellenmesinden (Antagonistik) Sorumlu Olası Biyokontrol Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi	72
4.4.4. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Bitki Büyüme Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi	77
4.4.5. Antagonist Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engelleyen Bölgelerinin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi	82
4.4.6. Antagonist Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi	83
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	88
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	103
EKLER	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Antifungal etkinlikleri belirlenen bitki uçucu yağlar ve ana bileşenleri.....	53
Çizelge 4.2. Farklı dozlarda kullanılan uçucu yağların antaknoz hastalık etmeni <i>C. karsti</i> 'nin misel gelişiminin (mm) engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği.....	57
Çizelge 4.3. Farklı dozlarda kullanılan uçucu yağların antaknoz hastalık etmeni <i>C. karsti</i> 'nin misel gelişiminin %engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği	58
Çizelge 4.4. Farklı konukçu bitkileri ve bitki kısımlarından izole edilen epifit ve endofit bakteri izolatlar, genel özellikleri ve MALDI-TOF tanı sonuçları	63
Çizelge 4.5. Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>Colletotrichum karstii</i> 'nin misel gelişimini engelleme potansiyelleri. Bakteri izolatları etkinliklerine göre sıralanmıştır.....	66
Çizelge 4.6. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların <i>C. karstii</i> 'nin misel gelişimini engellemede kullandıkları olası biyokontrol mekanizmaları ^a	72
Çizelge 4.7. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların bitki gelişimini teşvik eden IAA ve fosforu çözme potansiyeller.....	79
Çizelge 4.8. Farklı antagonist bakteri izolatların uçucu bileşenlerinin <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin radyal misel gelişimi (mm) üzerine etkinliği	83
Çizelge 4.9. <i>C. karstii</i> 'nin misel gelişimlerinin engellenmesi üzerine yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren endofit/epifit bakteri izolatların <i>in vitro</i> biyoetkinlik/bitki gelişimini teşvik edici mekanizmaları	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünyanın önemli turunçgil üretimi yapan ülkelerinde 2019 yılında gerçekleşen üretim miktarları (ton).....	3
Şekil 1.2. Dünyanın önemli avokado üretimi yapan ülkelerinde 2020 yılında gerçekleşen üretim miktarları (ton).....	5
Şekil 1.3. Türkiye'nin önemli avokado üretimi yapılan illerinde 2021 yılında gerçekleşen üretim miktarları (ton).....	5
Şekil 1.4. Hatay iliturunçgil (A-C) ve avokado (D-F) üretimi yapılan alanlardaki ağaçların sürgün, yaprak ve meyvelerde <i>C. karstii</i> hastalık etmeni tarafından oluşturulan tipik hastalık belirtileri (ok).....	9
Şekil 3.1. Uçucu yağın farklı konsantrasyonların buhar fazında <i>C. karstii</i> 'nin misel gelişimi üzerine antifungal etkinliğinin belirlenmesi. Petri kaplarında artan uçucu yağ konsantrasyona bağlı misel gelişiminde gözlenen küçülmeler (ok).....	35
Şekil 3.2. Uçucu yağın farklı konsantrasyonların buhar fazında <i>C. karstii</i> 'nin misel gelişimi üzerine fungisidal etkinliğinin belirlenmesi.....	36
Şekil 3.3. Hastalık etmeni <i>C. karstii</i> 'ye karşı biyokontrol etkinliği araştırılan antagonist bakteri izolatların izole edilmesinde kullanılan sağlıklı turunçgil ve avokado örnekleri.....	38
Şekil 3.4. Sağlıklı turunçgil/avokado dokularından izole edilen aday endofit (A), epifit bakteri kolonileri (B) ve bu kolonilerden saflaştırılan ve denemelerde kullanılan saf bakteri izolat kültürleri(C).....	39
Şekil 3.5. Sağlıklı turunçgil/avokado dokularından izole edilen aday endofit bakteri izolatların (A) tütün yaprağında aşırı duyarlılık (HR) ve (B-C) patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük testi. Tütün ve patates dilimlerinin inokulasyon noktalarında (*) HR ve yumuşak çürüklük testinde negatif veya pozitif (ok) sonuç veren aday antagonist bakteri izolatları gösterir. P, Patojen izolatların reaksiyonunu gösterir.....	41
Şekil 3.6. Sağlıklı turunçgil/avokado dokularından izole edilen aday endofit bakteri izolatların fungal hastalık etmenin misel gelişiminin engellenmesinin belirlenmesinde kullanılan <i>in vitro</i> ikili kültür testi.....	43
Şekil 3.7. Antagonist bakteri izolatların engelleme bölgesinde üretmiş oldukları bileşen(ler)in fungal etmenin misel (A) ve sporları (B) üzerine olan antifungal özelliklerinin belirlenmesi.....	45
Şekil 3.8. Antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen kimyasal bileşenlerin engelleme bölgesine yakın noktalarda (daire içinde gösterilen) fungal etmenin hifleri üzerinde neden oldukları morfolojik değişiklikler (ok).....	45
Şekil 3.9. Antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen uçucu bileşenlerin fungal etmenin misel gelişimini engelleme(ok) potansiyellerinin belirlenmesi.....	47
Şekil 3.10. Antagonist bakteri izolatlarının siderofor (A), proteaz (B), fosforu çözme (C), hidrojen siyanür (D), amonyak (E) ve indol asetik asit (F) üretme potansiyellerinin belirlenmesi.....	48
Şekil 4.1. Farklı bitki uçucu yağların buhar fazında <i>Colletotrichum karstii</i> 'nin misel gelişimini engellemesi üzerine olan antifungal etkinlikleri. (A) <i>O. syriacum</i> , (B) <i>F. vulgare</i> , (C) <i>L. Citridora</i> ve (D) <i>E. camaldulensis</i> uçucu yağlarının farklı dozlarda misel gelişimini engelleme potansiyellerini göstermektedir.....	55

- Şekil 4.2. *O. syriacum* (A), *F. vulgare* (B), *L. Citridora* (C) ve *O.majorona* (D) uçucu yağının misel gelişimini tamamen engelleyen MIC değerlerinde fungistatik ve fungisidal etkinlikleri. *O. Syriacum* 4.0 µl/petri, *F. vulgare* 6.0 µl/petri, *L. citridora* 10.0 µl/petri MIC değerlerinde fungisidal (ok) etkinlik gösterirken, *O. majorona* uçucu yağı 20.0 µl/petri dozundaki MIC değerinde fungistatik (ok), 25.0 µl/petri dozunda fungisidal etkinlik göstermiştir. 56
- Şekil 4.3. *O. syriacum* *C. karstii*'nin kontrol (A), *O. syriacum* (B-C), *F. vulgare* (D) ve *T. spicata* (E-F) uçucu yağların MIC dozlarına maruz kalmış petrilere gelişen miselleri üzerinde gözlenen morfolojik değişiklikler. Hiflerin sitoplazmalarında kontrol petrileredeki sağlıklı misellere kıyasla gözlenen koagülasyon (B, C, E), sitoplazmik içeriğin dışarı boşalması (C), hiflerin kenarlarında ince çıkıntı şeklinde oluşumlar (D), boğumlaşma ve genişleme (E-F) şeklinde ortaya çıkan morfolojik anormallikler (ok) 60
- Şekil 4.4. İkili kültür testlemeleri ile farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen *C. karstii*'nin misel gelişimini değişen oranlarda engelleme potansiyelleri..... 68
- Şekil 4.5. Farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının siderofor (A) ve proteolitik (proteaz) enzim üretme (B) potansiyelleri. Bakteri kolonileri (*) etrafında oluşturulan engelleme zonlarının (ok) genişliği test edilen antagonist bakteri izolatının etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir 75
- Şekil 4.6. Farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının amonyak (A) ve HCN üretme (B) potansiyelleri. Besi yerinin açık sarıdan koyu kahverengiye dönmesi (ok), petri içindeki filtre kağıdının sarı renkten kırmızı-kahverengiye (ok) dönmesi test edilen antagonist bakteri izolatının etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir 76
- Şekil 4.7. Farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının sıvı besi yerinde indol asetik asit (IAA) üretme potansiyelleri. (A) Sıvı besi yerinin sarıdan kırmızıya dönmesi test edilen antagonist bakteri izolatının IAA üretme etkinliğinin yüksek olduğunu gösterir. (B) *Serratia proteamaculans* KGT34en izolatı tarafından üretilen IAA miktarının 535 nm dalga boyundaki absorbans spektrası..... 78
- Şekil 4.8. Farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının fosforu çözme potansiyelleri. Bakteri kolonileri etrafında oluşturulan engelleme zonlarının (ok) genişliği test edilen antagonist bakteri izolatının etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir 81
- Şekil 4.9. Engelleme bölgesinde *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep izolatı tarafından biriken bileşiklerin fungusidal etkinliğinin belirlenmesi. Engelleme bölgesindeki (*) misel disklerinden (ok) gelişme görülmemesi bu bölgelerde üretilen bileşiklerin fungusidal etkinliğini göstermektedir. Kontrol petrisinde (B) acervulus yatakları (ok) gelişmiş olup, bakteri izolatının bulunduğu petrilere (A) acervulus yatakları oluşmamıştır..... 82
- Şekil 4.10. Farklı antagonist bakteri izolatlarının uçucu bileşenlerin ikili kültür testleri ile antifungal etkinliklerinin belirlenmesi. Üst petri kapaklarına çizili *Bacillus atrophaeus* KGT7en, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep izolatlarının uçucu bileşenleri alt petrideki PDA besiyerinde misel gelişimlerini değişen oranlarda engellemiştir 84
- Şekil 4.11. (A) *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep ve (B) *Bacillus mojavensis* KGT1ep izolatları tarafından sentezlenen bileşik(ler)in *C. karstii* sporlarının

çimlenmesi (ok) üzerine antagonistik etkinliğinin belirlenmesi. Antagonistik etkinlik koloniden 1, 2 ve 3 cm uzaklıklara yayılan konidiler üzerinde incelenmiştir85

Şekil 4.12. *C. karstii*'nin misel gelişimlerinin engellendiği ikili kültür petrilerinde hifler üzerinde gözlenen morfolojik deformasyonlar. (A) Kontrol petride gelişen sağlıklı hif. (B) *Bacillus mojavensis* KGT1epve (C) *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep izolatları tarafından oluşturulan engelleme bölgesine yakın noktalardaki hiflerde boğumlaşma (B), koagülasyon ve sitoplazmik içeriğin dışarı boşalması (C) şeklinde ortaya çıkan morfolojik anormallikler (ok).....86



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Derece Celsius
ha	: hektar
da	:dekar
µg	: mikrogram
mg	: miligram
g	: gram
kg	: kilogram
mL	: mililitre
µl	: mikrolitre
min	: Dakika
ppm	: part per million (milyon birimde bir birim)
rpm	: rotation per minute (dakikadaki dönme sayısı)

KISALTMALAR

TÜİK	: T ürkiye İ statistik K urumu
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (F ood and A griculture O rganisation of The United Nations)
PW	: P epton W ater
UV	: U ltraviyole
HCN	: H ydrogen C yanide (Hidrojen Siyanür)
CAS	: C hrom A zurol- S Agar Besi yeri
SMLBA	: S MLuria B roth Agar Besi yeri
NH ₃	: Amonyak
KB	: K ing's B Agar Besi yeri
LB	: L uria B ertani Agar Besi yeri
NA	: N utrient Agar Besi yeri
PDA	: P atates D ekstroz Agar Besi yeri
TSA	: T rypic S oybean Agar Besi Yeri
HR	: H ypersensitive T est (Tütün aşırı duyarlılık testi)
MALDI-TOF	: M atriks A ssisted L aser D esorption I onization T ime of F light M ass S pectrometry
ITS	: I nternal T ranscribed S pacer
IAA	: I ndol A setik A sit
PVK	: P ikovskaya Agar Besi yeri
MG	: M ycelial G rowth (Misel Gelişimi)
MGI	: M ycelial G rowth I nhibition (Misel Gelişimin Engellenmesi)
rDNA	: R ibosomal D N
rRNA	: R ibosomal R N
PCR	: P olimeraz C hain R eaction
PGPB	: P lant G rowth P romoting B acteria (Bitki Gelişimini Teşvik eden Bakteri)

YEA : **Y**east **E**xtract **A**gar (Maya Bazlı Agar)
VOC : **V**olatile **O**rganic **C**ompounds (Uçucu Organik Bileşikler)
SPSS : **S**tatistical **P**ackage for the **S**ocial **S**ciences



1. GİRİŞ

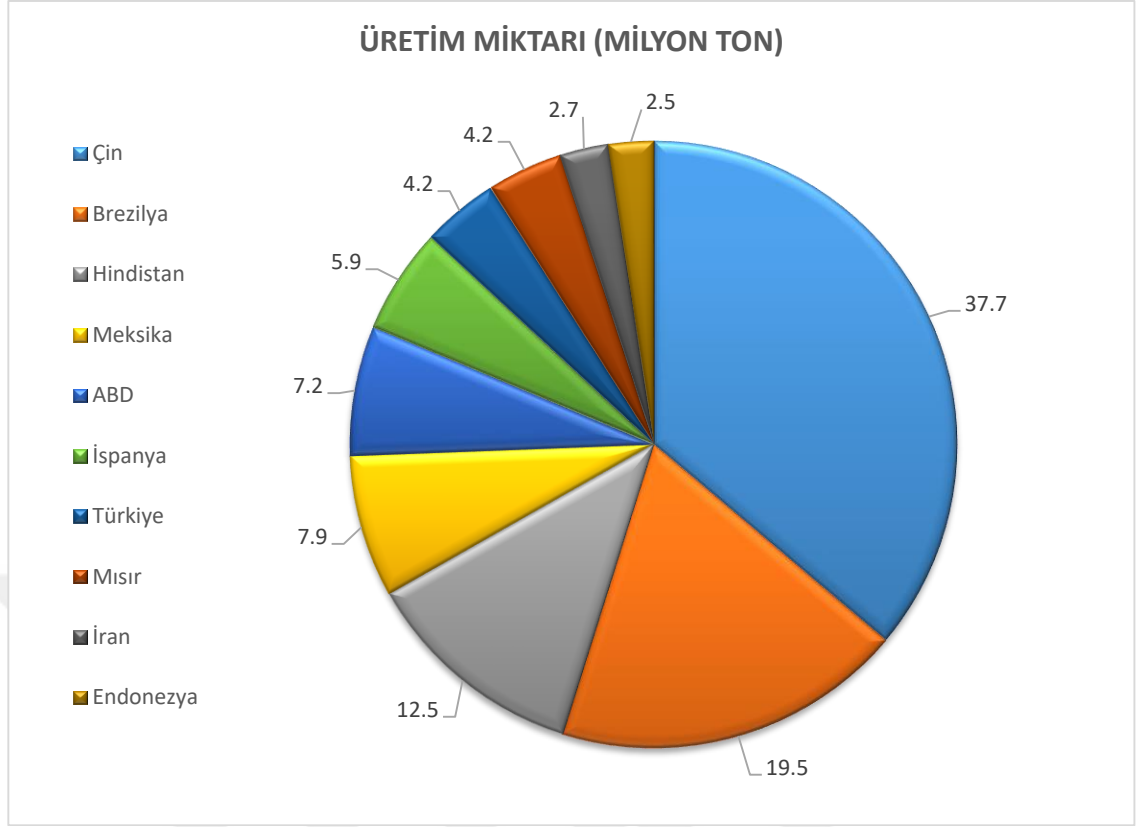
Günümüz dünyasında tüketicilerin sağlıklı beslenme konusunda bilinçlenmesinin bir sonucu olarak beslenme alışkanlıkları değişmekte, bu değişimle birlikte insanların tropik ve subtropik meyvelere olan ilgisi de giderek artmaktadır. Ülkemizde ekonomik öneme sahip yetiştiriciliği yapılan tropik ve subtropik meyvelerin başında farklı turuncgil çeşitleri olmak üzere, zeytin, incir, nar, avokado, pikan cevizi, kivi, muz, Trabzon hurması gelmektedir. Ülkemiz ekonomisinde büyük öneme sahip lokomotif tarımsal ürünlerden biri olan ve Anavatanı Güneydoğu Asya olan Turuncgiller, Arap yarımadasının doğusundan Filipinler'in doğusuna, Himalayalar ile Hindistan'dan Avustralya'ya kadar olan bölgeyi içine alan geniş bir coğrafyada yetiştiriciliği yapılan dünya ekonomisinde önemli bir yere sahip meyvelerdir. *Geraniales* takımında *Rutaceae* familyasına dahil olan turuncgiller portakal(*Citrus sinensis*), limon(*Citrus limon*), şadok(*Citrus maxim*), greyfurt(*Citrus paradisi*), ağaç kavunu(*Citrus medica*), bergamot (*Citrus bergamia*), mandarin(*Citrus reticulata*), turunc(*Citrus aurantium*) ve kamkat (*Fortunella japonica*) gibi farklı türler içerir (Manner ve ark., 2006).

Turuncgillerin insan sağlığı açısından birçok faydası vardır. Meyveleri vitaminler ve mineraller bakımından oldukça zengindir. Kendilerine has kokuları, tatlı ve ekşi bir tada sahip olmalarının yanı sıra içerdikleri C vitamini ile kış aylarında insanları hastalıklardan koruyan doğal kurtarıcı olarak bilinir ve tüketilirler. Büyüme ve gelişmede yardımcı, deri, göz, diş ve diş eti sağlığını koruyucudurlar. Ayrıca hastalıklara karşı direncin oluşumunda etkindirler. Doygunluk hissi vermeleri, bağırsakların düzenli çalışmasına yardımcı olmaları sayesinde vücut ağırlığı denetiminde de faydalıdırlar. Kış aylarında insanları soğuk algınlığından korur. Kalsiyum içeriği yüksektir, bu nedenle kemikler için oldukça faydalıdır. Böbreklerde taş oluşumunu engeller ve hâlihazırda bulunan küçük taşların böbreğin iç yüzeyine tutunmasını engelleyici etki yapar. Kemik iliğinde kan üretiminin artmasına fayda sağlaması, kansızlığa iyi geliyor olması, limon başta olmak üzere tüm turuncgillerin tansiyon düşürücü bir etkisinin bulunması gibi birçok faydası günümüzde turuncgillerin bol miktarda tüketilme nedenlerinden bazılarıdır.

Turuncgillerin iklim istekleri, bahçe kurulması ve çeşit seçiminde belirleyici rol oynamaktadır. Turuncgillerin anavatanları semitropik ve tropik bölgeler olmasına

karşın, sofralık kaliteye sahip turunçgiller subtropik kuşakta yetiştirilmektedir. Ülkemizde Akdeniz Bölgesinde hâkim olan iklim orta subtropik iklim olup, turunçgil tarımı ve yetiştiriciliği açısından oldukça uygun alanlar olarak kabul edilirler. Genel anlamda turunçgiller için büyüme sıcaklığı 12.8°C olarak kabul edilir. Türlerle bağlı olarak bu değerler değişmekte olup, örneğin limonlarda bu nokta 6-7 °C civarındadır. Turunçgillerde gelişme, sıcaklık 18-20 °C kadar hızlanan bir eğilim gösterir. Büyüme 26-28 °C de tepe noktasına ulaşır. Bu nokta büyümenin en hızlı, fotosentez etkinliğinin en yüksek olduğu yerdir. Bunlarla birlikte toprak turunçgiller için temelde bir destek ve dayanak vazifesi görmektedir. Turunçgiller için esas üzerinde durulması gereken husus toprağın havalandırılan bir yapıya sahip olmasıdır. Çünkü turunçgil kökleri yüksek miktarda oksijen ister, havasızlığa çok duyarlıdır. Ağır ve havalandırılmayan topraklarda hemen boğulma tepkisi gösterirler. Bu sebeple turunçgillerin yetiştirileceği toprağın öncelikle havalandırılan ve süzek bir yapıda olması mecburiyeti vardır.

Ülkemizde elma ile üzümünden sonra ticari anlamda en fazla yetiştiriciliği yapılan turunçgil türlerinin portakal, limon, mandarin ve altıntop olduğu bildirilmiştir (TÜİK, 2021). Dünyada genelinde 2019 yılında 9 milyon 750 bin ha alanda 138 milyon ton turunçgil üretimi yapılmıştır. Turunçgil üretiminde ilk sırada 37.7 milyon ton ile Çin yer almış olup, bu ülkeyi sırasıyla 19.5 milyon ton ile Brezilya, 12.5 milyon ton ile Hindistan, 7.9 milyon ton ile Meksika, 7.2 milyon ton ile ABD, 5.9 milyon ton ile İspanya takip etmiştir. Ülkemiz 4.2 milyon ton turunçgil üretim ile dünya genelinde yedinci sırada yer almıştır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Dünyanın önemli turunçgil üretimi yapanülkelerinde 2019 yılında gerçekleşen üretim miktarları (ton)

Dünya turunçgil üretim alanının en kuzey sınırında yer alan Türkiye, turunçgil yetiştiriciliği için uygun ekolojik koşullara sahip ülkelerden biridir. Türkiye iklim olarak ılıman iklime sahip olduğu için tüm kıyı bölgelerinde turunçgiller yetiştirilebilmektedir. Ilık ortamlarda yetişen turunçgiller, Akdeniz, Güney Ege ve Güney Marmara turunçgil yetiştirmek için uygun bölgeler arasında bulunur. Türkiye’de turunçgil yetiştiriciliğinin%82’si Akdeniz bölgesinde,%17’si ise Ege bölgesinde yapılmaktadır. Akdeniz bölgesinde en fazla ve kaliteli turunçgil yetiştiriciliği Hatay, Mersin, Antalya ve Adana illerinde yapılmaktadır.

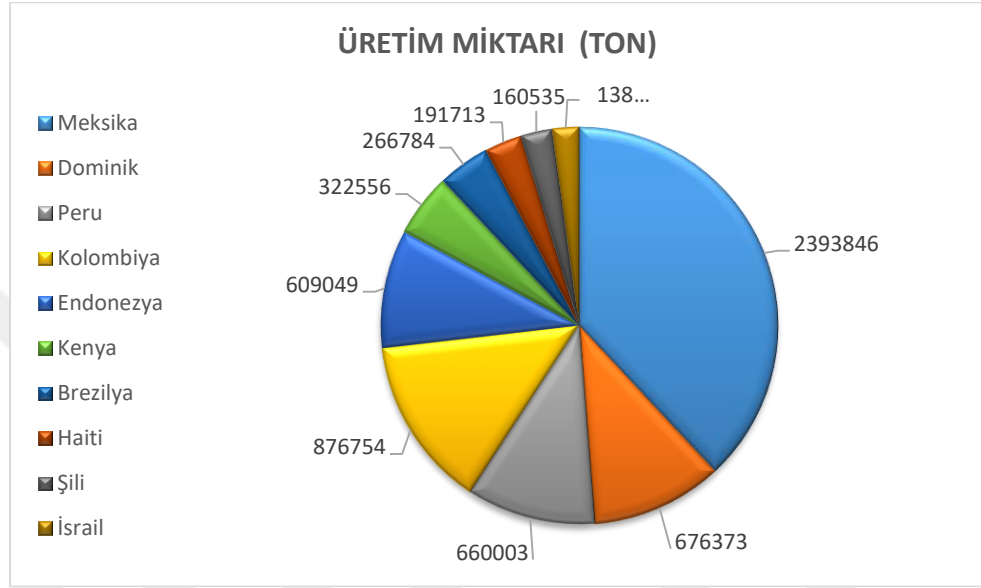
Türkiye’de 2021 yılında toplam turunçgil üretimi 5.362.615 ton olarak bildirilmiş olup, toplam üretim içinde1.819.000 ton üretim miktarı ile mandarin1. sırada yer almıştır. Bu türü sırasıyla, 1.742.000 ton üretim miktarı ile portakal, 1.550.000 ton üretim miktarı ile limon, 249.000 ton üretim miktarı ile altıntop ve 2.615 ton üretim miktarı ile turunç takip etmiştir (TÜİK, 2021). Akdeniz bölgesinin Hatay ilinde 2021 yılında gerçekleşen turunçgil üretiminin 717 bin tonumandarin, 354 bin tonuportakal,

147 bin tonu limon, 12 bin tonu altıntop ve 213 tonu turunç olmak üzere ortalama 1 milyon 230 bin ton olduğu bildirilmiştir (TÜİK, 2021). Dünyada yapılan toplam üretim sıralamasında ülkemiz mandarin üretiminde 4. altıntop ve limonda 8. ve portakalda ise 10. sırada yer almaktadır (Anonymous, 2019).

Turunçgillerin yanı sıra son yıllarda tüketicilerin yoğun ilgi gösterdiği bir diğer subtropik meyvelerin başında avokado meyvesi gelmektedir. Orta Amerika ve Meksika'ya özgü, herdem yeşil bir subtropik meyve ağacı olan Avokado (*Persea americana* Mill.)'nın anavatanı Orta Amerika ülkeleri, Güney Amerika'nın kuzey sahilleri ve Batı Hint Adalarıdır. Avakodo ağacı Dünya genelinde en fazla üretimi yapılan 4. subtropik meyve olan avokado, 5 kıtada 50'ye yakın ülkede yetiştirilmektedir (Knight, 2002; Guerrero-Barajas ve ark., 2020). Avokado ismi ilk kez 1915 yılında "Avokado Birliği" tarafından Kalifornia eyaletinde kullanmış olup, bu tarihten sonra giderek dünya geneline yayılmıştır. Günümüzde avokado birçok ülkede gıda, sağlık ve kozmetik alanında kullanılmaktadır. Avokadonun insan sağlığına birçok faydası vardır bunlar; Avokado kalbe yararlıdır. İçerisindeki beta-sitosterol sayesinde kolesterolün belli bir seviyede kalmasını sağlar. Günlük olarak tüketildiğinde damar sertliğinden korunur, prostat ve meme kanseri başta olmak üzere kanser hücrelerinin oluşumuna engeller. Zira, avokado, hücreleri kansere ve serbest radikallerin tehlikeli etkilerine karşı koruyan bir antioksidan olan Glutasyon içerir. Ayrıca, avokadonun içinde bulunan vitamin ve minerallerin cilt sağlığı açısından oldukça yararlı olduğu birçok araştırmada kanıtlanmıştır. İyi bir potasyum kaynağı olan avokado, bu özelliği ile böbrek hastalıklarının önüne geçer ve böbreği korumuş olur. Tam bir K vitamini deposu olan bu tropikal meyve, K vitamini eksikliğinden kaynaklı hastalıklara iyi gelir. Görmeyi geliştirir. Avokado, gözleri kataraktve yaşla ilgili hastalıklarına karşı korumaya yardımcı olan lutein ve zeaksantin gibi karotenoidler içerir. Avokadonun beslenme dışında dudak kremi, yüzü ölü hücrelerden arındırma, deri çatlaklarıyla savaşmada, gözaltında, saç maskesi, makyaj temizleyici olarak kullanılmaktadır.

Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nun 2020 yılı üretim verilerine göre Dünya genelinde yaklaşık 810 000 ha alanda 8 milyon ton avokado üretimi yapılmıştır (Anonymous, 2020). Avokado üretiminde ilk sırada 2.4 milyon ton ile Meksika yer almış olup, bu ülkeyi sırasıyla yaklaşık 876.754 ton ile Kolombiya, 676.373ton ile Dominik, 660.003 ton ile Peru, 609.049ton ile Endonezya, 322.556ton ile Kenya

ülkeleri takip etmiştir (Şekil 1.2). Avokado, dünyada birkaç ülkede son derece farklılaşan çevrelerde, önemli ticari tarımsal ürün olarak yetiştirilmektedir (Bower ve Cutting, 1988). Yetiştiricilik alanlarının sınırlı olması nedeniyle birçok ülke avokadoyu dışalım ile karşılamaktadır. Gerçekten de avokado yüksek besin değeri ve kendine özgü tadıyla, pazarda yüksek fiyatla alıcı bulmaktadır (Crane, 1989).



Şekil 1.2. Dünyanın önemli avokado üretimi yapan ülkelerinde 2020 yılında gerçekleşen üretim miktarları (ton)



Şekil 1.3. Türkiye'nin önemli avokado üretimi yapılan illerinde 2021 yılında gerçekleşen üretim miktarları (ton)

Avokado meyvesi, dünyada tropik iklime sahip ülkeler/bölgelerin yanında ülkemizde subtropikal iklime, sahip çeşitli bölgelerde de yetiştirilir. Türkiye’de avokado yetiştiriciliği 1970’li yılların başında başlamıştır. Ülkemize ABD’nin Kaliforniya eyaletinden getirilen avokado fideleri Antalya, Alanya, Muğla, Dalaman, Hatay ve İskenderun başta olmak üzere Ege ve Akdeniz sahil şeridine dikilmek suretiyle yetiştirilmeye başlanmıştır. Avokado Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi'nde Antalya'dan İskenderun'a kadar olan bölgenin yanı sıra Ege bölgesinde Muğla ili ve çevresinde yetiştirilmektedir. Türkiye’deki avokado üretiminin yaklaşık %75-80’i Antalya’da, %15-20’si Mersin’de ve %2-5’i diğer illerde (Muğla ve Hatay) üretilmektedir (Şekil 1.3). Türkiye’de yetiştirilen belli başlı avokado türleri Zutano, Ettinger, Fuerte, Hass, Bacon, Pinketon ve Wurtz olarak bilinmektedir.

Türkiye’nin avokado üretimi 2016 yılı değerlerine göre 1950 ton, 2017 yılında 2765 ton ve 2018 yılında ise 556 da alanda 3164 ton olarak bildirilmiştir (FAO, 2019). Türkiye’de 2021 yılında avokado üretiminin 9.081 ton olduğu bildirilmiştir. Üretimin 7.102 ton gibi büyük kısmı Akdeniz Bölgesinde Antalya ilinde yer almaktadır. Antalya ilini sırasıyla 1.788 ton ile Mersin, 106 ton ile Hatay, 79 ton ile Muğla ve 6 ton ile Adana illeri takip etmiştir (TÜİK, 2021). Ülkemiz avokado üretim değerleri incelendiğinde, son on yılda üretim alanında yaklaşık 5 kat, üretim miktarında ise yaklaşık 3 kat artış görülmüştür (FAO, 2019).

Ülkemiz ekonomisinde büyük öneme sahip, lokomotif tarımsal ürünlerden olan turunçgillerin yanısıra son yıllarda tüketimi hızla artan subtropik meyvelerden avokado üretim yapılan alanlarda tarımsal mücadele, gübreleme, sulama, ilaçlama, budama gibi üretici yanlışlıkları oldukça fazla görülmekte ve bu durum bitkilerde hastalıkların oluşumuna ve dolayısıyla verimin düşmesine, kalitenin azalmasına sebep olmaktadır.

Turunçgiller, ülke ekonomisi ve insan beslenmesi için önemli bir yere sahiptir. Turunçgil özellikle Ege ve Akdeniz Bölgeleri’nde yetiştirilmektedir. Turunçgil yetiştiriciliğinin bitki korumayla ilgili önemli sorunları (hastalık, zararlı ve yabancı ot) bulunmaktadır. Bu sorunların başında fungal hastalıklar yer almaktadır. Antraknoz (*Colletotrichum* spp.), turunçgilde kahverengi leke (*Alternaria alternata* f.sp.citri), uçkurutan [*Phoma tracheiphila* (Petri) L.A. Kantsch.-Gik.], solgunluk (*Fusarium oxysporum*, *F. solani*) ve turunçgil meyvelerinde kahverengi çürüklük ve gövde

zamklanması [*Phytophthora citrophthora* (Smith and Smith) Leonian] farklı turunçgil türlerinde ekonomik kayıplara neden olan fungal hastalıklar olarak bildirilmiştir (Timmer ve ark., 2000). Turunçgil ağaçlarındaki fungal hastalıklarla mücadele büyük önem arz etmektedir. Mücadele edilmediği takdirde doğrudan verim kaybına dolaylı olarak ise ağaçların yıldan yıla zayıflamasına ve hastalıklara karşı hassasiyetin artmasına neden olmaktadır. Benzer şekilde avokado ağaçlarında görülen fungal hastalıklarda bulunmaktadır.

Son yıllarda ülkemizde yetiştiriciliği yapılan turunçgil ve avakodo ağaçları, etiyolojileri yeni araştırılmaya başlayan birçok fungal etmen tarafından ciddi düzeylerde zarar gördüğü bilinmektedir. Farklı morfolojik yapıdaki fungal hastalık etmenler turunçgil ve avokado ağaçlarının yaprak, sürgün, dal ve ana gövdelerinde kurumalar şeklinde görülen geriye doğru ölüm belirtilerine neden olmuştur.

Dünyada ve ülkemizdeki turunçgil ve avakodo ağaçlarında antaknoz hastalık etmenlerinin oluşturduğu hastalık belirtileri sıkça karşılaşılmakta olup, bu tür ağaçların sürgün, yaprak ve meyvelerinden antraknoz hastalık etmeni *Colletotrichum* spp. ait fungal etmenlerin izole edilerek tanılanmıştır.

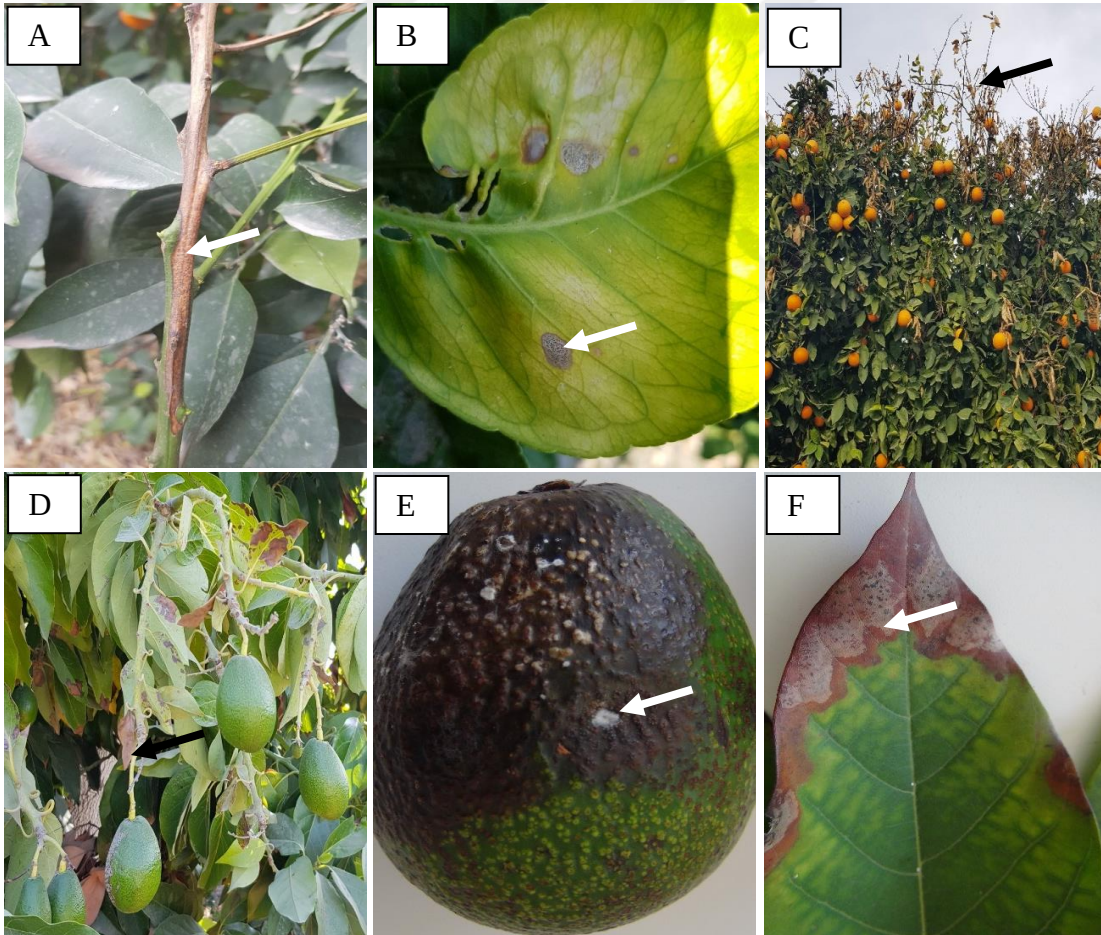
Antraknoza neden olan *Colletotrichum* türleri genellikle zayıflık patojeni olarak değerlendirilir. Hastalık etmeni türler geniş bir konukçu aralığına sahip olup toprakta çürüyen bitki artıkları, meyve, sürgün ve yapraklarda aservulus şeklinde yıllarca canlılığını koruyabilir (Canon ve ark., 2012; Dean ve ark., 2012). Serbest nem ve 10-30°C arası sıcaklıklar, konukçu enfeksiyonunu kolaylaştırır. Fungal konidyum ve mikrosklerotlar, enfekteli toprağa doğrudan temas eden konukçu dokuyu enfekte edebilir ve sıçrayan yağmurla ve yağmurlama sulama yöntemi ile konukçu dokuya bulaşabilir. Ardından dokuya doğrudan nüfuz edebilir veya yaralardan girebilir. Kök enfeksiyonu genellikle farklı patojen enfeksiyonların yarattığı bitki zayıflığı, hastalık etmeninin inokulum yoğunluğunun yüksek olması veya uygun olmayan yetiştirme koşullarından dolayı bitkilerde beslenme stresi ortaya çıktığı durumlarda görülür. Yüksek nemin olduğu durumlarda hasat esnasında, paketleme evlerinde, depoda ve pazarda diğer meyvelere bulaşabilir. Enfeksiyonlar sonucu meyveler üzerinde tipik antraknoz belirtileri meydana gelir. Turunçgillerde antraknoz etmeni *Colletotrichum*, ülkemizde özellikle limon başta olmak üzere birçok turunçgil tür ve çeşitlerinde şiddetli enfeksiyonlara yol açmaktadır. Enfeksiyon meyvelerde, dallarda, yapraklarda ve

köklerde görülebilir. En ağır enfeksiyon meyve, sürgün ve kök bölgelerinde görülmektedir. Meyve yeşil haldeyken enfekte olmasına karşın, olgunlaşana kadar hastalık belirtileri görülmez. İlk lezyonlar çökmüş ve dairesel haldedir ve genişledikçe iç içe halka işaretleri ile çökmüş hale gelir. Lezyon merkezleri ten rengine gelir ve çok sayıda koyu leke (mikro sklerotlar) gelişir. Nemli havada, lezyon yüzeyi üzerinde çamurlu, pembe, jelatinimsi bir kütle halinde çok sayıda konidyum gelişir. Enfekteli köklerde kahverengi lezyonlar gelişirken, kök yüzeyinde mikrosklerotlar gelişir. Bu hastalık belirtilerinden dolayı, siyah lekeli kök çürüklüğü adını da almıştır. Bu belirtilere bitkilerin tüm vejetatif ve generatif organlarında rastlanmaktadır. Meyvelerde belirtiler dairesel, kahverengi-siyah, nemli lezyonlar olarak ortaya çıkmıştır. Avokado bahçesinde, yere dökülen yapraklar ve ağaçta kalan, yaprak ayasında ve yaprak kenarlarında ortaya çıkan büyük kahverengi nekrotik lezyonlar şeklinde belirtiler görülmüştür (Uysal ve Kurt, 2019).

Colletotrichum spp. ait fungal hastalık etmenleri dünyada ekonomik öneme sahip pek çok konukçu bitkilerde %10-80 oranında değişen verim ve kalite kayıplarına neden olan “ilk 10 patojen” arasında yer alan taksonomik olarak oldukça kompleks bir yapıya sahip hastalık etmenidir (Dean ve ark. 2012). *Colletotrichum*cinsine dahil farklı türler 3000 farklı bitki türünde hastalık oluşturduğu bilinmektedir (Damm ve ark. 2012a,b; Farr ve Rossman, 2020). Bünyesinde 100 den fazla kompleks türleri barındıran *Colletotrichum*cinsi aynı konukçuda farklı türler veya farklı türlerde aynı etmen tarafından hastalık oluşturulabilir (Cannon ve ark., 2012). Yaygın türü olan *C. gloeosporioides* tür kompleksi aralarında turuncgil ve avakodo olan bitkilerde 30 farklı türü barındırır (Huang ve ark., 2013). Son yıllarda morfolojik özelliklerin yeterli olmaması nedeniyle, ITS, GAPDH, ACT, CAL, CHS-1, HIS3 and TUB2 gibi mikroorganizmaların belirli korunmuş gen bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı Multilokus Sekans Analizlerin (MLSA) yapıldığı moleküler çalışmalarla tür kompleksi daha detaylı incelenmiştir. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds, *Colletotrichum boninense* Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib. ve *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc gibi 3 adet oldukça detaylı bir şekilde tanımlanmıştır (Damm ve ark., 2012; Weir ve ark., 2012; Guarnaccia ve ark., 2017). Bu türlerin dünyada olduğu gibi ülkemizde yetiştirilen çeşitli subtropik meyvelerden turuncgil, nar ve avokado ağaçlarında dal, sürgün yanıklığı, yapraklarda ve meyvelerde

nekrotik lekelenmeler şeklinde ortaya çıkan hastalık belirtilerine neden olduğu bildirilmiştir (Uysal ve Kurt, 2018a,b; Uysal ve Kurt, 2019a,b; Kurt ve ark. 2020; Farr ve Rossman, 2020).

Ülkemizde yetiştirilen turunçgillerde ve avokado ağaçlarında son yıllarda tespit edilen bir yeni türün yapılan moleküler analizler sonucunda *C. gloeosporioides*'in yanısıra *C. karstii* olduğu bildirilmiştir (Uysal ve Kurt, 2018a,b; Uysal, 2019; Uysal ve Kurt 2019a,b; Uysal ve Kurt, 2020). Sörvey yapılan bölgelerde turunçgil ve avokado ağaçlarında hastalık etmeninin diğer *Colletotrichum* spp. tarafından oluşturulan belirtilere benzer şekilde dal, sürgün yanıklığı, yapraklarda ve meyvelerde nekrotik lekeler ve bu lekelerin ortalarında tipik aservulus yatakları şeklinde ortaya çıkan hastalık belirtilerine neden olmuştur (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Hatay iliturunçgil (A-C) ve avokado (D-F) üretimi yapılan alanlardaki ağaçların sürgün, yaprak ve meyvelerde *C. karstii* hastalık etmeni tarafından oluşturulan tipik hastalık belirtileri (ok)

Turunçgil ve avokado üretim alanlarında antraknoz etmeni *C. karstii*'ye karşı mücadele yöntemlerinin araştırılması konusunda kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Söz konusu hastalık etmeni *C. karstii* ile yapılmış bir mücadele çalışması olmamakla birlikte, diğer bazı *Colletotrichum* spp. ile mücadelede genelde kısıtlı sayıda yapılan çalışmalarda bazı fungusitlerin etkinliği araştırılmış olup, hastalık etmenine karşı test edilen fungusitlerin etkinliği oldukça değişken olmakla birlikte, test edilen birçok fungusitin etkinliklerinin düşük düzeylerde olduğu bildirilmiştir (Uysal ve Kurt., 2019b). Antraknoz hastalık etmenleriyle kimyasal mücadele oldukça zor olmakla birlikte, genelde thiophanate-methyl, benzimidazoles ve dithiocarbamate grubuna dahil fungusitler (mancozeb), ergosterol synthesis engelleyiciler (e.g., difenoconazole, myclobutanil and prochloraz) gibi sentetik fungusitlerle mücadele edilmeye çalışılmaktadır (Hu ve ark., 2014). Antraknoz hastalığıda dahil olmak üzere bitki fungal ve bakteriyel kökenli hastalıklara karşı kimyasal mücadele kullanılan ilaçların insan ve hayvan sağlığına olan olumsuz etkilerinin yanı sıra çevredeki hedef dışı faydalı organizmalara olumsuz etkisi, ürün üzerinde neden olduğu kalıntı sorunu, hedefteki hastalık etmenlerinin kullanılan fungusitlere karşı dayanıklılık geliştirmesi gibi olumsuzluklar kimyasal uygulamalardan beklenen başarıyı sağlayamaktadır (Zheng ve ark., 2013; Sonker ve ark., 2014; Ramdial ve ark., 2017). Günümüzde bilinçli tüketicilerin sentetik kimyasalların insan sağlığına ve çevreye verdiği zarar hususunda bilinçli olmasının yanı sıra gelişmiş ülkelerde pestisit uygulamalarına getirilen çeşitli yaptırım ve sınırlamalar, kullanılan kimyasallara karşı fungusların kısa sürede dayanıklılık geliştiren yeni ırk/izolatların ortaya çıkması gibi olumsuzluklarından dolayı söz konusu fungal etmenlerle mücadelede kimyasal pestisitlere alternatif çevre dostu, yeni mücadele yöntemlerinin araştırılması zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır (Soliman ve Badeaa, 2002; Zheng ve ark., 2013).

Son yıllarda tarımsal öneme sahip bitkisel ürünlerde sorun olan fungal hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlerin önem verilmeye başlanmıştır. Söz konusu hastalıklarla kimyasallara alternatif yöntemler olarak; (i) bitkilerden, kök ve kök bölgesindeki topraktan (rizosfer) izole edilen antagonist ve bitki gelişimini teşvik eden (PGP, Plant Growth Promoting) bakteriyel (PGPB) ve fungal (PGPF) mikroorganizmaların kullanıldığı biyolojik mücadele; (ii) bitkisel (bitki ekstrakt ve uçucu yağlar) ve hayvansal (propolis vb) kökenli antimikrobiyal bileşenler; (iii) biyotik

ve abiyotik uyarıcıların kullanıldığı “sistemik teşvik edilmiş dayanıklılık (SAR)” söz konusu hastalıklarla mücadelede kimyasal pestisitlere alternatif mücadele yöntemlerin başında gelir (Sturz ve ark., 2000; Fravel, 2005; Conrath, 2006; Bakkali ve ark., 2008; Sülü ve ark 2016; Kumari ve ark., 2017; Dimkic ve ark., 2022).

Her ne kadar hastalık etmeni *Colletotrichum* spp.’nin bildirildiği diğer ülkelerde kısıtlı sayıda mücadele çalışmaları olmakla birlikte, bölgemiz için olduğu kadar ülkemiz içinde yeni rapor edilen antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum karstii*’ye karşı gerek ülkemizde gerekse diğer ülkelerde yapılmış herhangi bir biyolojik mücadele çalışması bulunmamaktadır. Diğer yandan, hastalık etmenin misel gelişiminin engellenmesi üzerine limon otu (*Cymbopogon citratus*) ve nane (*Mentha piperita*) bitki uçucu yağı ile yapılmış *in vitro* çalışmalar (de Oliveira ve ark., 2017; Oliveira ve ark., 2018) dışında uçucu yağların antifungal etkinliğinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada Hatay ili turunçgil ve avokado yetiştiriciliği yapılan alanlarda yakın zamanda hastalık etmeni olarak bildirilen *C. karstii* ile organik tarıma temel teşkil edecek kimyasallara alternatif mücadele yöntemleri araştırılmıştır. Bu kapsamda, Hatay ilinin farklı bölgelerinde doğal olarak yetişen karabaş kekik (*Thymbra spicata* var. *spicata* L.), kaba kekik (*Thymus serpyllum* L.), Suriye Kekiği (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii*), limon otu (*Lippia citriodora* L.), greyfurt kokulu nane (*Mentha x piperita* f.sp. *officinalis* L. var. 'Aura'), mercanköşk (*Origanum majorana* L.), okaliptüs (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.), rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.), turunç (*Citrus aurantium* L.) ve çakşır (*Ferula communis* L.) gibi tıbbi ve aromatik bitki uçucu yağların ile sağlıklı turunçgil ve avokado ağaçlardan izole edilen endofit ve epifit antagonist bakteritürlerinin *in vitro* antifungal etkinlikleri belirlenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hastalık Etmeni *C. karstii*'nin Dünya ve Ülkemiz Genelindeki Durumu ile İlgili Çalışmalar

Peng ve ark. (2012), Çin'in Guizhou ve Yunnan illerinde yetiştiriciliği yapılan Turunçgil ağaçlarının hastalık belirtisi gösteren yapraklarından toplam 38 farklı *Colletotrichum* izolatı elde etmişlerdir. Elde edilen izolatlarla yapılan morfolojik ve multi lokus sekans analizi (MLSA) çalışmaları sonucunda en yaygın türün 29 izolat ile *C. gloeosporioides* olduğu, bu türü sırasıyla 2'şer izolatla *C. fructicolaveC. karstii*, 1'er izolatla *C. boninense*, *C. brevispora*, *C. simmondsii* ve *C. murrayae* türlerinin izlediği bildirilmiştir. *Colletotrichum murrayae* türünün Çin'de yetişen turunçgil ağaçlarının yapraklarında hastalığa neden olduğu ilk kez bu çalışma ile bildirilmiştir.

Huang ve ark. (2013), Çin'in önemli turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelerdeki hastalıklı *Citrus* ve *Fortunella* türü ağaçlardan yaptıkları 312 farklı *Colletotrichum* izolatı elde etmişler, elde edilen izolatlarla detaylı morfolojik ve ACT, TUB2, CAL, GAPDH, GS, ITS gen bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı moleküler tanılama çalışmaları sonucunda *Colletotrichum* izolatlarının, *C. gloeosporioides* tür kompleksi, *C. boninense* tür kompleksi, *C. acutatum* tür kompleksi ve son olarak *C. truncatum* tür kompleksi olmak üzere 4 büyük tür kompleksine ait olduklarını belirlemişlerdir. *C. gloeosporioides* tür kompleksinin *C. gloeosporioides* ve *C. fructicola*, *C. boninense* tür kompleksinin *C. karstii* ve yeni bir tür olan *C. citricola*, *C. acutatum* tür kompleksinin ise yeni bir tür olarak belirlenen *C. citri* türlerini içerdiğini bildirmişlerdir. İzolatların turunçgil meyvelerinde yapılan patojenite testi sonucunda *C. gloeosporioides*, *C. fructicola* ve *C. truncatum* patojen olarak belirlenmiştir.

Aiello ve ark. (2015), Güney İtalya'nın Catania, Siracusa ve Enna illerinde yetişen turunçgil ağaçların hasat öncesi dal, sürgün, yaprak ve meyvelerinde nekrotik leke ve kurumlara neden olan 56 fungus izolatın morfolojik ve moleküler tanılama çalışmaları sonucunda 44 tanesinin *C. gloeosporioides*, 12 tanesinin ise 44 tanesini *C. karstii* olduğunu belirlemişlerdir.

Ramos ve ark. (2016), Portekiz’de liman ağaçlarının sürgünlerinde geriye doğru ölüm ve kurumlara neden olan muhtemel hastalık etmenlerini araştırdıkları çalışmalarında, izole edilen fungal etmenlerinin ileri moleküler teknikler ile *C. gloeosporioides* ve daha önceden *C. boninense* tür kompleksinden aktarılmış olan *Colletotrichum karstii* olarak teşhis etmişlerdir. Söz konusu iki fungal türün farklı turunçgil tür/çeşitlerin hastalıklı sürgün, yaprak, çiçek, meyvelerinde izole edilmiştir. Ülkede her ne kadar yaygın tür olarak daha önceden bildirilen *C. acutatum* yapılan sörveylerde hastalıklı dokularda tespit edilmemiştir. Hastalık etmenlerinden yaygın türün %87 ile *C. gloeosporioides* olduğu, limonda sürgün ve dallarda kurumaların genelde *C. karstii* tarafından neden olunurken, *C. gloeosporioides* sadece çiçeklerden izole edilmiştir. Yapılan patojenite çalışmalarında *Colletotrichum karstii* ve *C. gloeosporioides* portakalların yaprak, çiçek ve meyvelerinde hastalık oluştururken referans *C. acutatum* izolatu test edilen turunçgil çeşitleri arasında sadece lime limon çeşidinin çiçek ve yapraklarında hastalık oluşturduğunu bildirilmiştir.

Douanla-Meli ve ark. (2017), 17 farklı coğrafik bölgede yetişen 9 farklı turunçgil çeşidinden elde ettikleri 454 farklı *Colletotrichum* izolatlarının tanımlanması çalışmalarında, ACT, ApMat, CHS-1, GAPDH, ITS, TUB2 gen bölgelerine spesifik MLSA sonucunda, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum karstii* ve *Colletotrichum siamense* türlerini belirlemişlerdir. *Colletotrichum* türlerinin yaygınlığı ve hastalık şiddetlerinin turunçgil çeşitlerine göre değişiklik gösterdiği, en yoğun ve şiddette hastalığın portakal (*Citrus sinensis*) ağaçlarının meyvelerinde olduğunu bildirmişlerdir. En yaygın tür *C. Gloeosporioides* olurken bu türü *C. siamense*’nin takip ettiği belirlenmiştir.

Guarnaccia ve ark. (2017), Avrupa ülkelerinde yetişen turunçgil ağaçlarında sorun olan *Colletotrichum* izolatlarının genetik çeşitliliği üzerine detaylı bir çalışma yapmışlardır. Sörveyler 2015-2016 yıllarında Avrupanın önemli turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı Yunanistan, İtalya, Malta, Portekiz ve İspanya ülkelerinde yapılmış ve yapılan izolasyonlarda 174 izolat toplanmıştır. ITS, GAPDH, ACT, CAL, CHS-1, HIS3 ve TUB2 genlerine spesifik multilokus sekans analiz (MLSA) sonucunda, *Colletotrichum* izolatlarının *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. helleniense* ve *C. hystricis* olmak üzere 3 önemli tür kompleksine ait olduklarını belirlemişlerdir. Yapılan detaylı çalışmalarda *Colletotrichum karstii*, *C. novae-zelandiae* ve iki önemli diğer tür

(*C. catinaense* ve *C. limoncola*) *C. boninense* tür kompleksi içinde olduğu, *C. acutatum* olarak belirlenen izolatın ise *C. acutatum* tür kompleksine dahil olduğunu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Colletotrichum gloeosporioides* ve *C. karstii*'nin izole edilen ve tanılanan *Colletotrichum* türleri arasında en yaygın türler olduğu, *C. acutatum* Avrupadaki Turunçgillerde ilk kez belirlendiğini, benzer şekilde, *C. novae-zelandiae* türünün Yeni Zelanda dışında ilk kez Avrupa'da tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Daoud ve ark. (2019), Tunus'un kuzey bölgesindeki önemli Turunçgil üretim alanlarında dal ve sürgünlerde kurumlara neden olan hastalık etmenlerinin belirlenmesine yönelik sörvey çalışmalarında kurumakta olan hastalıklı bitki örneklerinden 7 farklı tek spordan türetilmiş fungal etmen izolatı elde etmişlerdir. Yaptıkları morfolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda 7 izolattan 6 tanesinin *C. gloeosporioides*, 1 tanesininde *C. karstii* olduğunu belirlenmiştir. Elde ettikleri sonuca göre hastalık etmeni *C. karstii* Tunus'da yetişen turunçgillerde hastalığa neden olduğunun ilk kayıdır.

Mayorquin ve ark. (2019), Kalifornia vadisinde turunçgil dal, sürgün ve yapraklarında kurumlara neden olan fungal hastalık etmenlerinin araştırdıkları çalışmalarında, kurumlardan sorumlu fungal türlerden birinin *C. gloeosporioides*, diğerinin ise daha önce bildirilmemiş bir etmen olduğunu gözlenmiştir. Yaptıkları detaylı morfolojik ve moleküler analizler sonucunda Kaliforniya Vadisinde yetişen turunçgil ağaçların dal ve sürgünlerde kurumlara neden olan söz konusu etmenlerin *C. gloeosporioides* ve *Colletotrichum karstii* olduklarını, etmenlerden *Colletotrichum karstii*'nin bölge için ilk kez bildirildiğini rapor etmişlerdir.

Uysal ve Kurt (2019), ülkemizin Akdeniz bölgesinde yetiştiriciliği yapılan limon ve mandarin bahçelerinde 2011 yılında yapmış oldukları sörveyler sırasında ağaçların sürgün ve yapraklarda kurumlara neden olan hastalık etmenini izole edip, standart morfolojik ve moleküler yöntemler kullanarak etmeni *Colletotrichum karstii* olarak teşhis etmişlerdir.

Ferreira ve ark. (2020), topraktan izole edip tanımladıkları farklı *Trichoderma* spp turunçgil meyvelerinde hasat sonrası önemli çürüme ve kayıplara neden olan fungal hastalık etmenlerinden *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata* ve *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı biyolojik mücadelede kullanım olanaklarını araştırmışlardır. İzolasyonlar sonucunda 7 izolatı *Trichoderma harzianum*, *T. guizhouense*, *T.*

atroviride ve *T. koningiopsis* olarak teşhis etmiş olup, bu izolatlardan 5 tanesinin fungal etmenlere karşı *in vitro* antagonistik etkinlik gösterdiklerini belirlemişlerdir. İzolatlar arasında *T. harzianum* IC-30 izolatının hasat sonu çürümeleri %80 oranında engellemek suretiyle en iyi etkinlik gösteren etmen olduğu bildirilmiştir. Bu izolatın kitinaz ve glukinaz enzim aktivitesi göstermek suretiyle antagonistik etkinlikte bulunduğunu belirlenmiştir.

Uysal ve Kurt (2020), 2016 yılında yapmış oldukları sörveyler sırasında ülkemizin Akdeniz bölgesinde yetiştiriciliği yapılan Avokado (*Persea americana* Mill.) ağaçlarının yapraklarında kurumalara neden olan fungal hastalık etmenini yaprak üzerinde oluşturulan nekrotik lekelerden izole etmişlerdir. Elde edilen fungal izolatlar, standart morfolojik ve ITS, GAPDH ve ACTIN gen bölgelerine spesifik multi lokus sekans analizlerin (MLSA) kullanıldığı moleküler yöntemler kullanarak yapılan tanılama çalışmaları sonrasında *Colletotrichum karstii* Türkiye’de yetişen avokadolar için ilk kez hastalık etmeni olarak rapor edilmiştir.

2.2. Antraknoz Hastalık Etmenleri (*Colletotrichum* spp.) ile Kimyasallara Alternatif Mücadele Konusunda Yapılan Çalışmalar

Colletotrichum’un farklı türlerinin neden olduğu antraknoz hastalıkları, hem derim öncesi bahçe koşullarında hem de derim sonrası depo koşullarında önemli kayıplara neden olduğu için bu fungal patojen üzerinde bilimsel çalışma yapılması zorunlu duruma gelmektedir. Dünya genelinde turuncgil ve subtropik diğer meyve ağaçlarında sorun olan antraknoz hastalıklarının mücadelesinde yaygın ve pratik olarak farklı etkili maddeye sahip fungusitler kullanılmaktadır. Bazı *Colletotrichum* spp. ile kimyasal mücadelede çalışmalarında, hastalık etmenine karşı test edilen fungusitlerin etkinliğinin oldukça değişken etkinliklerde ve düşük düzeylerde olduğu bildirilmiştir (Uysal ve Kurt., 2019b). Şili’de yetiştirilen biber meyvelerinde sorun olan antraknoz hastalığı için azoxystrobin (Quadris), trifloxystrobin (Flint) ve pyraclostrobin (Cabrio) gibi fungusitler önerilmektedir (Alexander ve Waldenmaier, 2002; Lewis ve Miller, 2003).

Yapılan literatür incelemelerinde ülkemiz ve bölgemizde yeni rapor edilen antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum karstii*’ye karşı gerek ülkemizde gerekse

diğer ülkelerde yapılmış herhangi bir biyolojik mücadele çalışması bulunmamaktadır. Hastalık etmenin misel gelişiminin engellenmesi üzerine bitki uçucu yağ ve özütlerin antifungal etkinliği konusunda ise sadece 2 çalışmaya rastlanılmıştır. Farklı ülkelerde turunçgil, avakodo ve diğer tarımsal öneme sahip ürünlerde *Colletotrichum* spp.'ye karşı bitki uçucu yağ ve biyolojik mücadele konusunda yapılmış çalışmalar aşağıda kronolojik sıraya göre özetlenmiştir.

Koomen ve Jeffries (1993), tarafından yapılan çalışmada mango ağacının meyve ve yapraklarından izole ettikleri potansiyel mikrobiyal antagonistlerin biyoetkinliklerini fungal hastalık etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı araştırmışlardır. Yapılan izolasyonlar sonucunda toplam 648 fungal, bakteriyel ve maya izolatu izole edilmiş, tüm izolatların antagonistik etkinliği malt özütü agar (MAE) üzerinde *C. gloeosporioides*'e karşı test edilmiştir. Yapılan *in vitro* antagonistik etkinlik testlerinde bitki/bölgeyi temsilen 121 bakteri izolatu seçilerek fungal hastalık etmeninin misel gelişimini ve konidi çimlenmesini önleyici yetenekleri belirlenmiştir. Bu izolatlardan 45 bakteri ve maya izolatının spor çimlenmesini engellediğini bildirilmiştir. Seçilmiş izolatlar yapılan *in vivo* testlerde yapay olarak *C. gloeosporioides* ile enfekteli mango meyvelerinde antraknoz hastalığının gelişimini engelleme yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. Filipinler'de taze hasat edilmiş meyvelerde kullanılmak üzere 45 izolat arasından yedi izolat seçilmiştir. Sonraki denemeler için seçilen iki potansiyel bakteri izolatu *Bacillus cereus* 204 ve *Pseudomonas fluorescens* 558 olarak tanımlanmıştır. Her iki izolat ticari koşullarda hasat sonrası denemelerde, yayıcı yapıştırıcı, pepton, meyve mumu veya sakkaroz polyester ilavesi dahil olmak üzere farklı uygulama yöntemleriyle kombinasyon halinde kullanılmıştır. *Bacillus cereus* 204 izolatının uygulandığı meyvelerde hastalık gelişiminde herhangi bir azalma görülmezken *Pseudomonas fluorescens* 558 izolatının uygulandığı meyvelerde antraknoz gelişimi önemli düzeyde baskılanmıştır. Bakterilerin içerisine yayıcı yapıştırıcı, pepton, meyve mumu veya sakkaroz polyester ilave edildikten sonra yapılan uygulamalarda hastalık çıkışının engellenmesi açısından bir farkın görülmediği bildirilmiştir.

Korsten ve ark. (1995), Fuerte çeşidi avokado yaprakları ile meyve yüzeylerinden izole edilen epifit bakterilerin, fungal hastalık etmeni olan *Dothiorella aromatica*'ya karşı *in vitro* koşullarda antagonistik etkilerini belirledikleri çalışmada, 33 farklı bakteri izolatının *Colletotrichum gloeosporioides*, *Thyronectria pseudotrichia*, *Phomopsis*

perseae, *Pestalotiopsis versicolor*, *Fusarium solani*'ye karşı antibiyoz için test etmişlerdir. Test edilen hastalık etmenlerine karşı en yüksek antagonistik etkinliği sergileyen izolatın *Bacillus subtilis* B246 olduğunu bildirmişlerdir. *Bacillus subtilis*'in farklı konsantrasyonlarının ticari mumlama solüsyonuna (Tag-wax) eklendiğinde, meyvelerde *Dothiorella/Colletotrichum* hastalık kompleksi tarafından neden olunan antraknoz, meyve çürüklüğü ve gövde ucu çürüklüğü gibi hastalık belirtilerinin kullanılan bakteri süspansiyonların konsantrasyonlarına bağlı olarak önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre *Bacillus subtilis* izolatının hasat sonrası hastalıkların baskılanmasında oldukça tatmin edici performans sergilediği belirlenmiştir.

Yoshida ve ark. (2001), yapmış oldukları çalışmada sağlıklı dut yapraklarından elde ettikleri antagonist bakteri izolatı *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2'in sıvı besi yerinde ürettiği kültür filtratının (CFC) antagonistik özelliklerini dut bitkisinde antraknoza neden olan fungal hastalık etmeni *Colletotrichum dermatium*'a karşı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda ortaya koymuşlardır. Antagonist bakteri izolatı olan *Bacillus amyloliquefaciens*'in besi ortamında fungal hastalık etmenini engellediğini ve söz konusu engellenmenin bakteri tarafından üretilen antifungal bileşiklerden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Yaprakların üzerinde fungal etmenin gelişimi, sadece CFC'nın bitkiye hastalık etmeni inokule etmeden önce uygulandığında etkili olurken hastalık etmeni inokule ettikten sonra uygulamada hastalık çıkışının engellenmesinde başarılı olamadığını belirlemişlerdir. Sonuç olarak, bakteri CFC'nın içerisinde bulunan antifungal bileşiklerin hastalık üzerinde engelleyici bir etkisi olduğunu göstermiştir. Besiyerine Pepton'un ilave edilmesi antifungal bileşiklerin üretimini önemli düzeyde arttırmıştır. Farklı hastalık etmenleri ile yapılan *in vitro* etkinlik çalışmalarında, RC-2'nin hücre kültürü *Colletotrichum dermatium*'un yanı sıra *Rosellinia necatrix*, *Pyricularia oryzae*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gibi farklı fitopatojenik fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerin *in vitro* gelişimini engellemede etkili olduğu belirlenmiştir. Nükleer Manyetik Resonans (NMR) ve hızlı atom bombardımanı yöntemlerinin kullanıldığı analizler sonucu CFC içerisinde yedi farklı bileşenin bulunduğu, bunlardan birinin cyclic petid yapıda olan iturin A olduğu belirlenmiştir.

Yoshida ve ark. (2002), dut meyvesinde *Colletotrichum dematium*'un neden olduğu antraknoza karşı etkili mücadele yöntemlerinin geliştirmek için hastalıkla ilgili ekolojik ve biyolojik mücadele çalışmaları yapmışlardır. Sağlıklı dut yapraklarından yapılan izolasyonlar sonucunda *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 izolatu potansiyel antagonist adayı bakteri olarak izole edilmiştir. Bakteri tarafından gösterilen antagonistik etkinliğin bakteri tarafından üretilen antifungal bileşiklerden kaynaklandığı belirlenmiştir. Bakteri izolatu tarafından üretilen yedi çeşit antifungal bileşik saflaştırılmış olup, bunlardan biri iturin A2 olarak tanımlanmıştır. Antagonistik mekanizmalarına bağlı olarak, RC-2'nin hastalık çıkışının engellemesi için uygulamaların toprağa yakın yapraklara yapılması tavsiye edilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, bakteri tarafından üretilen antifungal bileşiklerin *C. dematium* dışında farklı fitopatojenik fungal ve bakteriyel hastalık etmenlere karşıda etkinlik göstermesi nedeniyle antagonist bakteri izolatının ürettiği olduğu antimikrobiyal bileşiklerin hastalık mücadelesinde çok yönlü biyofungusit olarak kullanılabileceğini bildirilmiştir.

Kim ve ark.(2004), tarafından yapılan çalışmada *Colletotrichum gloeosporioides* dahil fungal hastalık etmenlerin biyolojik mücadelesinde etkili bir antagonist izole etmeyi, sonrasında ise antagonist tarafından üretilen antifungal bileşenin saflaştırması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Biber antraknozuna karşı antifungal aktivite gösteren bakteriler arasında en yüksek etkinliği topraktan izole edilen *Bacillus thuringiensis* CMB26 izolatu göstermiştir. Antagonist *B. thuringiensis* izolatından izole edildikten sonra saflaştırılan lipopeptid'in "fengisine" isimli bileşiğine benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Elde edilen lipopeptid bileşiğinin, bir biyolojik mücadele etmeni olarak işlev görebilmesinin yanında fungisidal, bakterisidal ve böcek öldürücü aktivite sergilediği de belirlenmiştir. Biyolojik mücadele etmenlerinden klasik olarak izole edilen bileşiklerden biri olan sürfaktin ve iturin ile ikisi karşılaştırıldığında, *B. thuringiensis*'dan elde edilen lipopeptid'in, fitopatojenik etmenlere karşı daha güçlü antifungal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre lipopeptit Fengisin'in, sürdürülebilir tarımda patojenlerin biyolojik mücadelesi için aday bir doğal bileşen olduğu tavsiye edilmiştir.

Gunasinghe ve ark.(2004), yapmış oldukları çalışmalarında *Flavobacterium* sp. ve *Pantoea agglomerans* türlerine ait 2 farklı bakteri izolatının muzlarda taç çürüklüğü hastalığı etmeni *Colletotrichum musae* ve *Botryodiplodia theobromae* (*Lasiodiplodia*

theobromae) üzerindeki etkilerini belirlemek için *in vitro* ve *in vivo* biyoetkinlik çalışmaları yapmışlardır. Biyokontrol etmeni izolatlar muz meyvesinde Taç Çürüklüğü hastalığının çıkışının engellenmesi üzerine olan etkinliklerin, *in vitro* koşullardaki etkinliklere kıyasla daha yüksek oranlarda gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. İnce tabakalı kromatografi-biyoanalizler sonucunda *Flavobacterium* sp., tarafından üretilen antifungal bileşenlerin etkinliğinin *P.agglomerans* tarafından üretilen bileşenlere kıyasla daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Bakterilerin sıvı hücre kültürlerinde üretmiş oldukları bileşenlerin (CFCM) ısıya duyarlı olduğu, otoklav edilmiş CFCM bileşiklerinin *in vitro* koşullarda misel gelişimi üzerindeki antifungal etkinliğinin kısmen azaldığı, *in vivo* testlerde ise canlı bakteri hücre süspansiyonu uygulanmış muz meyvelerinde hastalık çıkışı baskılanırken, CFCM uygulamalarının hastalık çıkışının engellenmesi üzerinde etkili olamadığı kayıt edilmiştir. Antagonist bakterilerin farklı antibiyotik üretimlerine rağmen, *P. agglomerans*'ın Taç Çürüklüğü hastalığını büyük ölçüde baskılamış olması ortaya konulan antibiyozin bakterinin antagonizmasını tam olarak açıklamamıştır. Bakterilerden hazırlanan biyoformülasyonlar Taç Çürüklüğü gelişimini azalttığı gibi muz meyvelerinin en az 6 ay boyunca etkili şekilde depolanmasına katkıda bulunmuştur. Uygulamalardan elde edilen etkinlik fungusit Tiabendazol kadar etkili olmasa da iki lokal izolat, muz patojenlerinin biyolojik mücadelesine yönelik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

De Capdeville ve ark. (2007) papaya meyvesinin yaprak yüzeylerinden elde edilen epifit mikroorganizmaların biyokontrol etkinliklerini hasat sonrası papaya meyvelerinde antraknoz hasalığına neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırmışlardır. İzolasyonlar sonucu elde edilen 75 bakteri, 67 maya ve 22 fungus izolatı elde edilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda *C. gloeosporioides*'nin misel gelişimini engelleyen 30 maya izolat arasından 7 izolatın etkinliği ayrıca *in vivo* koşullarda araştırılmak üzere seçilmiştir. Moleküler çalışmalar sonucunda *Cryptococcus magnus* olarak tanımlanan CEN63 izolatı, hastalığı baskılamada en etkili izolat olarak belirlenmiştir. İzolatın hastalık gelişimini önlemede başarılı olabilmesi için en erken 24 saat önce uygulanmasının gerektiği, 48 saat önce yapılan uygulamanın ise en yüksek etkinliğe sebep olduğu bildirilmiştir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda, *C. magnus* izolatının ticari preparat olarak geliştirilme potansiyeline sahip aday bir mikroorganizma olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar çevre dostu biyokontrol etmeni

preparatının geliştirilmesi için sağlam bir temel oluşturmak üzere, bu maya izolatının fungusitlerle etkileşime girme kabiliyetine ilişkin etki mekanizmaları üzerine ek çalışmaların yapılma gerekliliğininde önermişlerdir.

Jayakumar ve ark. (2007), tarafından şeker kamışı kırmızı çürüklüğü hastalığının etmeni *Colletotrichum falcatum* mücadelesinde bitki ekstraktları ve antagonist mikroorganizmalarının tek veya kombinasyon halinde kullanıldığı bir biyolojik mücadele çalışması yapılmıştır. *Abrus precatorius* ve *Bassia latifolia* yaprak ve *Curcuma longa* rizom ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının uygulandığı petrilere *Colletotrichum falcatum*'un misel gelişimi sırasıyla %80, %58 ve %57 oranlarında engellenmiştir. Saksı deneylerinde *Pseudomonas fluorescens* Md1 veya *A. precatorius* ile ayrı ayrı muamele edilen şeker kamışı bitkileri üzerinde %20.1 ve %24.2 ile en düşük kırmızı çürüklük hastalık oranları görüldükçe, bitki ekstraktlarının hiçbirisi tarla koşullarında hastalık çıkışının engellenmesi üzerine etkili olmadığını bildirilmiştir. Bazı bitki ekstraktların antagonist bakterilerle kombine olarak uygulandığı durumunda ise hastalık çıkışının gözle görülebilir derecede kontrol altına alındığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, şeker kamışı Kırmızı Çürüklüğü Hastalığının engellenmesi için antagonist mikroorganizmalarla birlikte bitki bazlı özütlerin kombinasyon halinde tarlada uygulandığında daha etkili bir mücadele yöntemi olduğu bildirilmiştir.

Kefialew ve Ayalew (2008), tarafından Etiyopya'nın farklı bölgelerinde yapılan izolasyon çalışmalarında organik koşullarda yetişen mango ağaçlarından antagonist etkiye sahip fungal ve bakteriyel izolatlar elde edilmiştir. Elde edilen izolatların mango antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı antagonistik etkileri belirlenmiştir. Çalışmada dört bakteri, beş maya ve iki fungal etmen izolatlarının antagonistik etkinliğinin *in vitro* koşullarda değerlendirilmesi yapılmıştır. İzolatların hücre kültürleri ve süspansiyonları, *in vitro* olarak *C. gloeosporioides*'in spor çimlenmesinin ve hif gelişiminin önemli ölçüde engellediği bildirilmiştir. Yapay olarak hastalık etmeni ile inokule edilmiş mango meyvesinde biyolojik mücadele etmeni izolatların antraknoz hastalığı şiddetini etkili bir şekilde azalttığı gözlenmiştir. *Brevundimonas diminuta* B-62-13, *Stenotrophomonas maltophilia* L-16-12, *Enterobacteriaceae* L-19-13, *Candida membranifaciens* F-58-22 ve B-65-23 nolu izolatın doğal olarak enfekteli meyveler üzerinde hastalık çıkışını oldukça yüksek oranlarda engellediği bildirilmiştir. İzolatların mango ağaçlarına tek bir uygulaması ile

hasat edilen meyve üzerinde antraknoz hastalığının kontrolü için oldukça ümit verici potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir.

De Costa ve ark. (2008), Sri Lanka'da yetiştirilen farklı muz ağaçlarının meyve yüzeylerinden elde ettikleri antagonist bakteri izolatlarının biyokontrol potansiyellerini antraknoz hastalık etmeni *Colletotrichum musae*'ya karşı araştırmışlardır. Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen 44 bakteri ve 31 fungus kökenli toplam 75 biyolojik kontrol etmeni aday mikroorganizmanın %50'den daha fazlası, *in vitro* koşullarda *C. musae* kolonisinin gelişimini farklı oranlarda engellemişlerdir. *In vitro* koşullarda *C. musae*'ye karşı yüksek düzeyde engelleme gösteren 32 bakteri izolatu arasında seçilen 4 farklı bakteri izolatu *in vivo* etkinlikleri yapay olarak enfekte edilmiştir muz meyveleri üzerinde daldırma yöntemi ile belirlenmiştir. Antagonist bakteri süspansiyonu içine daldırılan enfekteli muz meyvelerinde antraknoz, taç çürümesi ve çiçek burnu çürüklüğü çıkışının önemli düzeyde engellediği görülmüştür. Test edilen 4 farklı izolat arasında, *Burkholderia spinosa* ileriye dönük bir biyokontrol etmeni olarak çalışmalarda kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda bakteri izolatu Taç Çürüklüğü Hastalığının engellenmesinde %86-98 oranında yüksek bir etkinliğe sahip olduğunu belirlemiştir. İzolatların *C. musae*'nin yanı sıra diğer fungal etmenleri olan *B. spinosa*, *C. gloeosporioide*, *Thielaviopsis paradoxa* ve *Botryodiplodia theobromae*'nin *in vitro* koşullarda misel gelişimini %45-73 oranlarında engellediği belirlenmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda ise *Burkholderia spinosa* izolatu ile uygulanan avokado, mango ve ananas meyvelerinde antraknoz ve gövde ucu çürüklüğü hastalık çıkışı %14-34 oranında engellemiştir. Bu bulgulara dayanarak, *B. spinosa*'nın muz meyvelerinde hasat sonrası hastalıklarının biyolojik mücadelesinde kullanılma potansiyeline sahip önemli bir aday biyolojik mücadele etmeni olduğu bildirilmiştir.

Kim ve ark. (2009), tarafından yapılan çalışmada, Kore'de çay ağaçlarının filoplanından izole ettikleri ve *Bacillus subtilis* BD0310 olarak tanımlanan izolatu antagonistik etkinliği fungal hastalık etmeni *Colletotrichum theae-sinensis* karşı araştırılmıştır. Araştırmacılar çay ağaçında izole ettikleri *Bacillus subtilis* BD0310 izolatu daha sonra SC tipi formulasyonda biyofungisit olarak formüle etmişlerdir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda bakteri izolatu oda sıcaklığında saklanan formülasyon içerisinde 12 ay boyunca canlı kalabildiğini, test edilen çay bitkilerinde ruhsatlı fungusitler arasında sadece bakır sülfata karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Serada

yapılan uygulamalar, biyofungisit hastalığa karşı koruyucu ve iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Tarla denemesi, biyofungisit ve kimyasal fungisit alternatifli şeklinde uygulamalarının, biyofungisit veya kimyasal fungisit tek şeklinde yapılan uygulamasından daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma, *B. subtilis* biyofungisitinin, çay tarlalarında antraknozun biyolojik mücadelesi için önemli açıdan etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

Alvandia ve Natsuaki (2009), Muz meyvelerinden izole edilen, biri kuru maya koloni oluşturan diğeri kremi beyaz kuru maya benzeri koloni oluşturan bakteri izolatlarını fungal hastalık etmeni *Lasiodiplodia theobromae*'ya karşı *in vitro* antagonist etkinliğini belirlemek için çalışmalar yapmışlardır. *Bacillus amyloliquefaciens* olarak tanımlanan izolatların, *Lasiodiplodia theobromae* etmenin yanı sıra taç çürüklüğü hastalıklarına neden olan *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae* ve *Fusarium verticillioides*'e karşı antagonistik etkinliklerini araştırmışlardır. *B. amyloliquefaciens* olarak tanımlanan bakteri izolatu hastalık etmenlerine karşı *in vivo* ve *in vitro* etkinlik çalışmalarında kullanılmıştır. *B. amyloliquefaciens* izolatının test edildiği tüm fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimini etkili bir şekilde durdurabilen antifungal metabolit ürettiği belirlenmiştir. *B. amyloliquefaciens* izolatının sıvı besi yerinde fungusun misel gelişimini ve konidi çimlenmesini önemli düzeyde engellediği bildirilmiştir. Muz meyvelerine püskürtme şeklinde uygulanan *B. amyloliquefaciens* izolatının uygulanmasından 2 gün sonra muz meyvelerini kolonize ettiği, patojenle arasında interparazitik etkileşimin gerçekleştiği gözlenmiştir. Paketleme evlerinde yapılan *B. amyloliquefaciens* uygulanması sonucunda, muz meyvelerinde taç çürüklüğü hastalığının çıkışını fungisit uygulamasına kıyasla önemli düzeyde baskılandığı bildirilmiştir.

Ortega-Morales ve ark. (2009), fungal hastalık etmenlerinden *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum fragariae* ve *Fusarium oxysporum*'a karşı *Bacillus mojavensis* (3 farklı izolatu) ve *Bacillus firmus* izolatlarının antagonistik etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Çalışmada maya ekstrakt agar (YEA) ve patates dekstrozu agar (PDA) üzerinde fungal etmenlerin engellenmesi üzerine bakterilerin farklı şekillerde uygulandığı ikili kültür testleri yapılmıştır. Genel olarak, yapılan çalışmalarda YEA ortamında gözlenen antifungal etkinliğin PDA ortamında kaydedilen etkinliğe kıyasla daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. İkili kültür testlerinde

fungus hastalık etmenlerinden *F. oxysporum*, bakterilere karşı daha dayanıklı (daha az engelleme) hastalık etmeni olurken *C. gloeosporioides* antagonist bakteri izolatlarından daha fazla etkilenen (en hassas) hastalık etmeni olduğu belirlenmiştir. Bakteriler tarafından gösterilen antagonistik etkinliklerin ön inkübasyon süresine bağlı olduğu, fungus inokulasyondan 1 gün önce geliştirilen bakterilerin göstermiş oldukları antagonistik etkinliğin, aynı gün birlikte yapılan ikili kültür test sonuçlarına göre daha yüksek etkinlik gösterdiği kaydedilmiştir. Genel olarak antagonist izolatlar arasında gösterilen etkinliğin istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık gösterdiği, *Bacillus* sp. MC3B-22 izolatı test edilen izolatlar arasında en etkili izolat olduğu belirlenmiştir. Bu izolat tarafından gösterilen etkinliğin ticari preparat (KodiakA) etkili bileşeni *Bacillus subtilis* G03'den daha yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir. Biyolojik mücadele etmeni *Bacillus* sp. MC3B-22 izolatının ayrıca *in vivo* testlerde hastalık etmenini başarılı bir şekilde baskılayarak hastalık çıkışını engellediği bildirilmiştir.

Gunasinghe ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmada, muz bitkisinde taç çürümesine neden *Colletotrichum musae* ve *Lasiodiplodia theobromae*'a karşı *Pantoea agglomerans* ve *Flavobacterium* sp. antagonist etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan mevcut araştırmada, bakteri izolatları tarafından hastalığın baskılanmasında kullanılan biyo-kontrol mekanizmaları belirlenmiştir. Araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara göre, hastalık etmeni *L. theobromae* daha virulent hastalık etmeni olduğu, antagonist bakterilerden *C. musae*'ya kıyasla daha az etkilendiği gözlenmiştir. Antagonist izolatların konidi çimlenmesinin engellenmesinde canlı hücrelerinin göstermiş olduğu etkinliğinin, hücresiz kültürlerine kıyasla daha yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda bakterilerin üretmiş oldukları ve konidi çimlenmesi üzerinde antifungal etkiye sahip bileşiklerin ısıya karşı dayanıklı, miseller üzerinde etkili olan bileşiklerin ise ısıya dayanıksız olduğunu belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, gelecekte antagonist bakterilerle yapılacak saha araştırmalarında antifungal bileşiklerin biyoetkinlikteki rollerine dikkat edilmesinin gerekliliğini önermiştir.

Slininger ve ark. (2010), tarafından yapılan çalışmada patates yumrularında kuru çürüklük, pembe çürüklük ve geç yanıklık gibi önemli patates hastalıklarının biyolojik mücadelesinde *Pseudomonas fluorescens* S11: P: 12, P22: Y: 05 ve S22: T: 04 ve *Enterobacter cloacae* S11: T: 07 izolatlarının farklı uygulama şeklindeki etkinlikleri

araştırılmıştır. Çalışmalarda bakteriler ayrı ayrı geliştirilip daha sonra karıştırma veya aynı besi yeri içinde birlikte geliştirildikten sonra yumrulara uygulanma şekillerinde uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 3 izolatın birlikte geliştirilmesiyle elde edilen bakteri süspansiyonun etkinliğinin 3 hastalığın çıkışında ve filizlenmenin engellenmesinde en etkili uygulama olduğu, bakteri izolatların birlikte kültüre alınmasının bakterilerin etkinliğinde sinerjik katkı sunduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucu araştırmacılar bakterilerin ayrı ayrı geliştirilip daha sonra karıştırılmasından ziyade birlikte kültüre alınmasının daha etkili bir uygulama şekli olduğu kaydedilmiştir.

Zivkovic ve ark. (2010), tarafından yapılan çalışmada, farklı meyvelerde antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichumacutatum* ve *Colletotrichumgloeosporioides* etmenlerine karşı *Trichodermaharzianum*, *Gliocladiumroseum*, *Bacillussubtilis*, *Streptomycesnoursei* ve *Streptomycesnatalensis*'den oluşan beş farklı biyolojik mücadele etmeninin antagonistik aktiviteleri, *invitro* koşullar altında incelenmiştir. *Colletotrichum* izolatına karşı uygulanan ikili kültür testinde mikrobiyal antagonistlerin, misel gelişimi ve konidi çimlenmesin yüksek derecede engellendiği gözlenmiştir. Test edilen izolatlar arasında iki *Streptomyces* türünün hastalık etmenleri *C.acutatum* ve *C. gloeosporioides*'e karşı en etkili antagonist bakteri türleri olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, *T. harzianum*, *G. roseum*, *B. subtilis*, *S. natalensis* ve *S. Noursei* izolatları meyvelerde antraknoz hastalığına karşı önemli etkinlikler gösteren biyolojik kontrol etmeni olarak tanımlanmıştır.

Kupper ve ark. (2010), Brezilya'da turuncgil yetiştiriciliğinde ciddi kayıplara neden olan antraknoz ve siyah leke hastalıklarına karşı *Bacillus subtilis* ACB-69 izolatının gerek *in vitro* gerekse *in vivo* koşullarda her iki hastalığa karşı biyokontrol etkinlik gösterdiğini, hastalık çıkışını önemli düzeyde azalttığını bildirmişlerdir.

Ji ve ark. (2010), tarafından yapılan çalışmada dut yapraklarından elde edilen endofitik bakteri izolatı *Burkholderia cepacia* Lu10-1'i dut yapraklarında sorun *Colletotrichumdematiume*'a karşı antagonistik ve bitki gelişimini teşvik etme potansiyeli belirlenmiştir. *B. cepacia* Lu10-1 izolatının yapılan *in vitro* etkinlik çalışmalarında *C. dematium*'un konidi çimlenmesini ve misel büyümesini engellediği, yapraklara veya toprağa uygulandığında, *B. Cepacia* Lu10-1 izolatının bitkide antraknoz gelişimini de başarılı bir şekilde baskıladığını gözlemlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara

göre, bakteri tarafından gösterilen etkinliğin izolat muamelesi ve patojenle aşılama arasındaki sürenin uzunluğuna göre değişiklik göstermiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, *B. cepacia* Lu10-1 izolatının hem steril hem de steril olmayan topraklarda 60 günden fazla yaşayabildiği belirlenmiştir.

Sangeetha ve ark. (2010), tarafından yapılan çalışmada muz meyvesi yüzeyinden ve rizosferden izole edilen dokuz, kültür koleksiyonundan altı bakteri olmak üzere toplam 15 izolat arasında, üç floresan olmayan (*Pseudomonas* NFP6, *Pseudomonas fluorescens* Pf3a, *Bacillus subtilis* BS1) izolatın yanısıra iki koleksiyondan temine edilen izolatın (*Azospirillum* AS1, *Azotobacter* AZ1), *in vitro* koşullarda taç çürüklüğü hastalık etmenleri olan *Lasiodiplodia theobromae* ve *Colletotrichum musae* fungal hastalığının misel gelişiminin maksimum düzeylerde engellemişlerdir. Etkili olarak belirlenen bu bakteri türlerinin aynı zamanda muz meyvelerinin *in vivo* şartlarda, taç çürüklüğü hastalık çıkışında önemli ölçüde engellediği, uygulamaların yapıldığı muz meyvelerinin raf ömrünü arttığı belirlenmiştir. Bakteri izolatlarının, üçlü kombinasyonlar (NFP6 + Pf3a + BS1) olarak uygulandığında, tek tek veya ikili kombinasyonuna kıyasla daha yüksek düzeylerde antagonist etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bakteri uygulanmış muz meyvelerinde normal uygulama yapılmamış meyvelere kıyasla 3-4 kat fazla oranda phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (PO), polyphenoloxidase (PPO) ve phenolic birikimine neden olmuştur.

Osman ve ark. (2011), *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 izolatının papaya meyvelerinde antraknoz hastalığının çıkışını önemli düzeyde engellediğini, 1-methyl cyclopropene uygulaması ile birlikte gerek hasat öncesi gerekse hasat sonrası meyveleri hastalığa karşı yüksek düzeyde koruduğunu bildirmişlerdir.

Mochizuki ve ark. (2012), topraktan izole ettikleri *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 izolatının antaknoz etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'nin ikili kültür testlerinde misel gelişimini oldukça yüksek etkinlikte baskıladığını, etmenin asma meyvelerinde ve çilek yaprağında yapılan *in vivo* etkinliklerde ise hastalık oluşumunu oldukça önemli düzeyde durduğunu belirlemişlerdir. S13-3 izolatının yapılan moleküler çalışmalarda iturin A isimli antimikrobiyal bileşeninin sentezlenmesinde rol oynayan ituD ve lpa-14 genlerine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Bakthavatchalu ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada topraktan izole edip moleküler olarak tanıladıkları *Pseudomonas aeruginosa* (FP6) izolatının antagonistik

etkinliklerini *Rhizoctonia solani* ve *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı araştırmışlardır. Söz konusu izolatın hastalık etmeni *Rhizoctonia solani* ve *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı geniş spektrumlu antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bakteriyel izolat tarafından üretilen antimikrobiyal bileşikler fungal etmenin hifleri üzerinde morfolojik anormalliklere neden olmuştur. Bakterinin phenazine-1-carboxylic acid, 2,4-diacetylphloroglucinol, ve pyoluteorin antibiyotiklerine özgü genlere sahip olduğu, bu metabolitlerin hastalık etmenlerinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda engellenmesinde önemli rol oynadıkları bildirilmiştir.

Dos Passos ve ark.(2014), yapmış oldukları çalışmalarında farklı yetiştirme teknikleri altında gelişen elma ağaçlarından bitki büyümesini teşvik eden (PGPB) bakterileri izole ederek *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı antagonistik etkinliğini belirlemişlerdir. Çalışma kapsamında, Güney Brezilya'da organik ve geleneksel bahçelerde yetiştirilen elma ağaçlarından kök ve rizosferik toprak örnekleri toplamışlardır. İzole edilen bakteriler, cins düzeyinde PCR-RFLP ve 16S rRNA'nın kısmi dizilimi ile tanımlanmalarının yanısıra izolatlar PGP yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. İzolasyonlar sonucunda en fazla sıklıkta tespit edilen bakteri cinsleri *Enterobacter* (%27.7), *Pseudomonas* (%18.7), *Burkholderia* (%13.7) ve *Rahnella* (%12.3) olarak belirlenmiştir. İzole edilen bakteriler arasından 69 izolat, *C. gloeosporioides*'e karşı antagonist aktivite göstermiştir. Sera denemelerinde, *Burkholderia* sp. 89 izolatının uygulandığı *C. gloeosporioides* ile enfekteli bitkilerde hastalık şiddeti %30 olarak belirlenirken, uygulama yapılmamış bitkilerdeki hastalık şiddeti %60-73 aralığında belirlenmiştir.

Amaresan ve ark. (2014), yapmış oldukları çalışmalarında biber bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin antagonistik potansiyellerini *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum capsici* ve *Pythium* sp. gibi fungal hastalık etmenlerine karşı araştırmışlardır. Endofitik bakterilerin %37.8'i *Pythium* sp.'ye, %35.1'i *F. oxysporum* ve *C. capsici*'ye ve %21.6'sı ise *S. rolfsii*'ye karşı değişen oranlarda antagonistik etki göstermiştir. Yapılan Microbial Identification System (Biolog) ve 16S rDNA sekans tanılama çalışmaları sonucunda *Bacillus* spp.'nin baskın antagonist türler olduğu belirlenmiştir. BOX-PCR parmak izleriyle karakterize edilen 23 antagonistik endofitik bakteri (AEB) izolatı, 19 farklı küme içinde grup oluşturduğu,

BECS7, BECS4 ve BECL5 izolatlarının tarla koşullarında bitki büyümesini teşvik ettiği, hastalık çıkışını azalttığı ve üründe yüksek verime neden olduğu belirlenmiştir.

Szilagyi-Zecchin ve ark. (2014), Mısır köklerinden elde ettikleri altı endofitik bakteriyi yapılan moleküler tanılama çalışmaları sonucunda, *Bacillus* sp. ve *Enterobacter* sp. olarak belirlemişlerdir. Elde edilen 6 izolat arasında CNPSO 2476, CNPSO 2477, CNPSO 2478 ve CNPSO 2480 izolatlarının azotu bağlama yeteneğinde olduğu, iki *Bacillus* sp. izolatının (CNPSO 2477 ve CNPSO 2478), IAA, sideroforlar ve litik enzimlerin üretimi bakımında yüksek düzeyde etkinlik gösterdiği, ancak tohum çimlenmesini azalttıkları için PGPB olarak uygun adaylar olmadığını belirlemişlerdir. Bununla birlikte, aynı izolatların fungal hastalık etmenlerinden olan *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Bipolaris maydis* ve *Cercospora zea-maydis*'e karşı antagonist etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Test edilen bakteriyel izolatlardan *Enterobacter* sp. CNPSO 2480 ve *Bacillus* sp. CNPSO 2481 izolatlarının sırasıyla kök gelişimini %44 ve %39, tohum çimlenmesini ise %47 ve %56 artırdığı kayıt edilmiştir. Bakteriler tarafından gösterilen etkinliklere göre, iki türün mısır bitkileri için gelecekte yapılacak testlerde “biyolojik aşılayıcılar” olarak için en uygun adaylar olduğu tavsiye edilmiştir.

Sawant ve ark. (2016), Hindistan’da asmalarda sorun antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*’e karşı antagonist bakterilerin biyolojik mücadele etmeni olarak etkilerini araştırmışlardır. Hindistan yarımadasındaki 43 üzüm bağından yapılan örneklemelerden 293 bakteri izole elde etmişlerdir. Elde edilen bakteri izolatları arasından 25 bakteri izolatının, *C. gloeosporioides*’in *in vitro* misel gelişimini önemli ölçüde engellendiği belirlenmiştir. Test edilen 25 izolat arasından ise 18 bakteri izolatının *in vivo* etkinlik çalışmalarında hastalık bulaşma oranını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda DR-38, DR-39, TL-171, DRo-198, TS-204, TS-205 ve DR-219 olarak etiketlenen antagonist izolatların morfolojik ve moleküler karakterizasyonlarına göre *Bacillus* spp. olarak tanımlanmıştır. *Bacillus* spp. ait izolatlar arasında DRo-198 dışındaki, izolatların tarlada yetiştirilen asmaların yaprakları üzerine 10^8 hücre/ml’de konsantrasyonunda uygulanan süspansiyonları, kontrol ile karşılaştırıldığında antraknoz hastalığının çıkışını önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir. TS-204 ve TL-171 izolatlarının uygulandığı asmalarda diğer beş izolata kıyasla daha düşük hastalık şiddeti kaydedilmiştir. Ayrıca TS-204 izolatının, *in*

vivokoşullarda üzüm meyvelerinin çürümesini etkili bir şekilde engellediği, TS-204 ve TL-171 izolatlarının üzümelerde antraknoz hastalığının biyolojik mücadelesinde kullanılabilir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

Zhou ve ark. (2016), *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı maya izolatu olan *Pichia membranaefaciens*'in tekli veya chitosan ile kombinasyon halinde uygulamaların etkinliğini araştırdıkları çalışmada *Pichia membranaefaciens*'in chitosan ile kombinasyon halinde kullanılması durumunda tekli kullanımlarına kıyasla daha yüksek biyokontrol etkinlik gösterdiğini, maya izolatının biyokontrol etkinlikte chitinase ve β , 1-3 glucanase litik enzimleri üretmek suretiyle misel gelişimini durduklarını bildirmişlerdir. Chitosan'ın spor çimlenmesini engellediği, misel yapısında morfolojik bozulmalara neden olduğunu, maya izolatının biyokontrol etkinliğini güçlendirdiğini belirlemişlerdir.

de Oliveira ve ark. (2017), Mango meyvelerinde antraknoz hastalığına neden olan 5 farklı *Colletotrichum* spp. (*C. asianum*, *C. siamense*, *C. fruticola*, *C. tropicale* ve *C. karstii*) misel gelişiminin engellenmesinde chitosan ve nane (*Mentha piperita*) bitki uçucu yağının ve kombinasyonların etkinliğini araştırdıkları çalışmada, chitosan (2.5, 5.0, 7.5 ve 10.0 mg/mL) ve nane uçucu yağın (0.3, 0.6, 1.25 2.5, ve 5.0 μ L/mL) test edildikleri konsantrasyonlarında çalışmada kullanılan tüm fungal etmenlerin misel gelişiminin *in vitro* koşullarda engellendiğini, uygulamaların karıştırılarak kullanıldığında sinerjik etkinlik görüldüğü, chitosan'ın 5.0 veya 7.5 mg/ml dozu ile uçucu yağın 0.6 veya 1.25 μ L/mL dozlarında meyveler üzerinde antraknoz belirtilerinin önemli düzeyde engellendiğini, etkinliğin kimyasal fungusit etkinliğine göre eşit veya daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Çalışma sonucu, chitosan-uçucu yağ karışımı şeklinde yapılan uygulamanın meyvelere kaplama şeklinde yapılması durumunda kimyasallara alternatif olarak hasatsonu antraknoz hastalığının önemli düzeyde baskılabileceğini göstermiştir.

Montiel ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada mango meyvelerinde antraknoz hastalık etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'a karşı dört maya (*Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula minuta*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus diffluens*) ve üç bakteri (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* ve *Stenotrophomonas rhizophila*) izolatın antagonistik etkinliğini araştırmışlardır. Test edilen maya ve bakteri izolatları tarafından *C. gloeosporioides* sporlarının çimlenmesi

in vitro koşullarda engellendiği bildirilmiştir. Mango meyveleri üzerinde test edilen *D. hansenii* ve *S. rhizophila* izolatu, hastalık çıkışının engellenmesinde %56 ve %89 oranda etki göstermiştir. Yapılan *in vitro* ve *invivo* alışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar, denemede etkinliği araştırılan maya ve bakteri izolatlarının mangoda antraknoz hastalığı için etkili biyolojik mcadeleetmenleri olabileceğini ortaya koymuştur.

Riera ve ark. (2017), yapmış oldukları çalışmada, *Candidatus Liberibacter asiaticus* hastalık etmeninin narenciye meyvelerini olumsuz yönde etkilediğini bildirmişlerdir. Sağlıklı turunçgil ağaçlarının kök bölgelerinden (rizosferinden) yapılan izolasyonda çok sayıda faydalı bakteri izolatu elde etmişlerdir. Yapılan n biyoetkinlik testlerde hastalık etmenine karşı antibakteriyel aktivite gösteren 6 izolat arasında en etkili türlerin *Agrobacteriumtumefaciens* ve *Sinorhizobiummeliloti* olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların yanında iki adet gram pozitif bakteri izolatu olan *Rhodococcus jialingiae* ve *Bacillus pumilus* teşhis edilmiştir. Turunçgillerde sorun olan üç farklı fungal hastalık etmeni *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Phyllosticta citricarpa* ile iki oomycete hastalık etmeni *Phytophthora nicotianae* ve *Phytophthora palmivora*'ya karşı teşhis edilen bakteri izolatların antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı testlemelerde, sadece turunçgil kök rklğ etmeni *Phytophthora nicotianae*'ye karşı dört antagonist (*Burkholderia territorii*, *Burkholderia metallica*, *Pseudomonas geniculata* ve *Bacillus pumilus*) bakteri izolatının etkili olduğu bildirilmiştir. Etkili olarak belirlenen 4 izolatın biyokontrol etki mekanizmalarının belirlendiği çalışmalar sonucunda; fosforu çözdüğü, siderofor ürettiği, demiri bağladığı, antimikrobiyal uçucu bileşenler ürettiği, osmokoruma sağladığı, bitki hormone ürettiği, antagonistik engelleme yaptığı ve besin rekabetine girdiği bildirilmiştir.

Oliveira ve ark. (2018), subtropik meyvelerden guava, mango ve papaya meyvelerinde antraknoz hastalığına neden olan 5 farklı *Colletotrichum* spp. (*C. asianum*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. tropicale* ve *C. karstii*)'nn misel gelişiminin engellenmesinde chitosan ve limon otu (*Cymbopogon citratus*) bitki uçucu yağının tekssel veya kombinasyon şeklindeki uygulamaların etkinliğini araştırdıkları çalışmada, chitosan (2.5, 5.0 ve 7.5 mg/mL) ve uçucu yağın (0.15, 0.3, 0.6 ve 1.25 μ L/mL) test edildikleri konsantrasyonlarında test edildikleri fungal etmenlerin misel gelişimini *in vitro* koşullarda engellendiğini, uygulamaların karıştırılarak kullanıldığında sinerjik etkinlik görüldüğü, chitosan'nın 5 mg/ml dozu ile uçucu yağın 0.15, 0.3, ve 0.6 μ L/mL

dozlarında meyveler üzerinde antraknoz belirtilerinin önemli düzeyde engellendiğini, etkinliğin kimyasal fungusit etkinliğine göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Çalışma sonucu, chitosan-uçucu yağ karışımı şeklinde yapılan uygulamanın meyvelere kaplama şeklinde yapılması durumunda hastalığın önemli düzeyde baskılanabileceğini göstermiştir.

Damasceno ve ark. (2019), muz meyvelerinde hasat sonrası önemli düzeyde ekonomik kayba neden olan antraknoz hastalık etmeni *Colletotrichum musae*'ya karşı 12 bakteri izolatını biyolojik mücadele etmeni (BCA'lar) olarak araştırmışlardır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda 12 izolat arasından, *Bacillus velezensis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* ve *Stenotrophomonas maltophilia* izolatları başarılı antagonist izolat olarak belirlenmiştir. Bu bakterilerden, *B. velezensis*'in *in vivo* koşullarda gösterdiği etkinliğin fungusit Thiabendazole (Tecto SC) ile benzer düzeyde olduğunu belirlemişlerdir. *B. velezensis* meyveler üzerinde misel gelişimini ve sporulasyonu engellediği, gösterilen antagonistik etkinliklerde etki mekanizmaları olarak selüloz ve ksilanaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre araştırmacılar hastalıkla hasat sonrası mücadelede *B. velezensis*'in muz meyvelerine sprey veya daldırma şeklinde uygulanabileceğini önermişlerdir.

Reyes-Perez ve ark. (2019), denizden izole ettikleri *Stenotrophomonas rhizophila*'nın mango meyvelerinde antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı *in vitro* ve *in vivo* biyokontrol etkinliğini ve etkinlikte rol oynayan etki mekanizmalarını araştırmışlardır. Yapılan analizlerde besin için rekabetin yanı sıra antagonist bakteriler tarafından üretilen uçucu bileşenler ve litik enzimlerin fungal etmenin misel gelişimini ve spor çimlenmesini engellemede kullandıkları başlıca mekanizmalar olduğu bildirilmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda meyvelere 10^8 hücre/ml konsantrasyonundaki bakteri süspansiyon uygulamalarının hastalık çıkışını %95 oranında, lezyon oluşumunu ise %85 oranında engellediğini, ortaya çıkan etkinliğin standart fungusit tarafından gösterilen etkinlikten daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmanın *Stenotrophomonas rhizophila*'nın mango meyvelerinde antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı *in vitro* ve *in vivo* biyokontrol etkinliğinin araştırıldığı ve bakteri uygulamasının fungusit uygulamasından daha etkin olduğunu gösteren ilk çalışma olduğu bildirilmiştir.

Ayon ve ark. (2020), Meksika’da üretimi yapılan tropik meyvelerden mango ve tarçın elması (*Annona muricata* L.) üretimi ve veriminin fungal hastalık etmenlerinden *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp. ve *Lasiodiplodia pseudotheobromae* tarafından ciddi tehdit altında olduğu bildirilmiştir. Araştırmacıların yapmış olduğu çalışmada, *Trichoderma*, *Bacillus* ve *Streptomyces* türlerine ait 9 farklı izolatın hastalık etmenlerinin gelişimini engellemedeki *in vitro* antagonistik etkileri araştırılmıştır. Test edilen izolatlar arasında *Trichoderma longibrachiatum* izolatı %57.9-60.45 arasında değişen oranda engelleme ile en yüksek antagonistik etkinlik göstermiştir. Bakteriyel antagonistler arasında *B. methylotrophicus* fungal etmenlerin gelişimini %58.2 engellerken, *Streptomyces* izolatları %88.3-100 oranlarında engelledikleri bildirilmiştir.

Reyes-Estebanez ve ark. (2020), Campeche eyaletindeki (Güney Meksika) mango (*Mangifera indica* L.) ağaçlarının yapraklarından elde ettikleri 108 bakteri izolatının *in vitro* antifungal etkinliğini *Colletotrichum gloeosporioides* var. *minor*’a karşı araştırmışlardır. Antagonistik izolatlar arasından seçilen TS3B-44, TS3B-45, TS3B-92 ve TS3B-183 izolatların hastalık etmenine karşı *in vitro* antagonistik potansiyelleri belirlenmiştir. Yapılan moleküler tanılama çalışmalarında *Bacillus velezensis* olarak belirlenen TS3B-45 izolatının test edilen bakteriler arasında en etkili antagonist olduğu bildirilmiştir. *Bacillus velezensis* TS3B-45 izolatının *in vitro* antagonist etkinliği (%80), fungusit prokloraz (%82) ve ticari *B. subtilis* izolatının (%77) göstermiş olduğu etkinliğe benzer etki göstermiştir. Bakteri izolatının ayrıca *Colletotrichum* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia clavata*, *Pestalotiopsis makulans*, *Fusarium nivale* ve *F. solani* dahil olmak üzere diğer fungal hastalık etmenlerinede etkisi olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, *B. velezensis*’in *in vivo* testlerde ticari preparat Serenade (*B. subtilis*) ile aynı etkinlik gösterdiği, *B. velezensis* TS3B-45 izolatının uygulama yapılan meyvelerde, 32 günlük depolama ve raf koşullarından sonra olgunluk indeksi, meyve ağırlığı, şekeri azaltma ve mangoların asitliği gibi kalite unsurları üzerinde etkisinin bulunmadığı bildirmişlerdir.

Shastri ve ark. (2020), şeker kamışı bitkisinin iç dokularından elde ettikleri endofit bakteri izolatlarının tanılanması, antraknoz hastalık etmeni *Colletotrichum falcatum*’a karşı antagonistik etki ve etki mekanizmalarının belirlenmesine yönelik yapmış oldukları çalışmalarda, farklı izolasyon yöntemleri kullanılmak suretiyle 118 farklı endofitik izolat elde etmişlerdir. Elde edilen izolatlardan sadece 29 izolatın fungal

etmene karşı *invitro* engelleme (antibiyotik üretme) etkinliği gösterdiği belirlenmiştir. Test edilen bakterilerin antagonistik etkilerinin yanı sıra fosforu çözme, IAA, siderofor, HCN, ACC deaminase ve amonyak üretimi gibi bitki gelişimini teşvik eden (PGP) mekanizmalardan bir veya birkaçına birden sahip oldukları belirlenmiştir. Engelleme yapan bakteriler arasında %75 ve üzeri oranda misel gelişimini engelleyen 6 farklı izolatu yapılan 16S moleküler teşhisleri sonucunda *Bacillus cereus* (S8), *B. aryabhatai* (S12), *B. subtilis* (S17), *B. licheniformis* (S26), *B. paramycoides* (R5), ve *Pseudomonas aeruginosa* (BS-4) türü olarak tanımlanmıştır.

Guerrero-Barajas ve ark. (2020), Avakodo antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı avakodo yetiştiriciliği yapılan alanlardaki topraklardan izole edilen 136 antagonist bakteri izolatu biyolojik mücadele etmeni olarak kullanıma potansiyellerini araştırdıkları çalışmada, sadece A1, A2 ve A3 olarak etiketlenmiş 3 izolatu hastalık etmeninin misel gelişimini sırasıyla %75, %70 ve %60 oranlarında engellediğini belirlenmiştir. Yapılan moleküler analizler sonucunda antagonistik etkinlik gösteren bu 3 izolattan iki tanesi 16S rRNA analiz tanı sonucuna göre *Bacillus mycoides* (A1 and A2) diğer izolat ise *Bacillus tequilensis* (A3) olarak tanımlanmıştır. Bu 3 izolattan *Bacillus mycoides*'in hücre kültürü fungal etmenin misel gelişimini %65 engellerken diğer bakterilerin hücre kültürleri misel gelişimini sadece %25 düzeyinde engelleyebilmiştir. Antagonist bakteri izolatlarının etkinlik mekanizmalarının belirlendiği çalışmalar sonucunda *Bacillus mycoides* A1 izolatu proteases, indolacetic acid ve siderophores ürettiği belirlenmiştir. Yapılan *in vivo* etkinlik çalışmalarında *B. mycoides* A1 izolatu hücre kültürü uygulanmış meyvelerde hastalık çıkışının %41.9 oranında engellendiği gözlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini Hatay ili turunçgil ve avokado ekim alanlarından izole edilmiş *Colletotrichum karstii* izolatının (Uysal and Kurt, 2019a; Uysal ve Kurt, 2020) yanı sıra sağlıklı turunçgil türleri ile avokado ağaçlarının kök, yaprak, sürgün ve meyve gibi farklı bitki kısımlarından elde edilen endofit ve epifit karakterli bakteri izolatları; Hatay ilinin Samandağ, Antakya, Yayladağı, Erzin ilçelerinde doğal olarak yetişen bitkilerden elde edilen bitki uçucu yağları, biyoetkinlik çalışmalarında kullanılan besi yerleri, plastik ve cam laboratuvar ekipmanları oluşturmuştur

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Uçucu Yağları, Kimyasal Bileşenleri ve *Colletotrichum karstii*'ye Karşı *in vitro* Antifungal Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.1.1. Bitki Uçucu Yağların Elde Edilmesi

Çalışmalarda antifungal etkinlikleri araştırılan uçucu yağlar Hatay ilinin farklı bölgelerinde doğal olarak yetişen karabaş kekik (*Thymbra spicata* var. *spicata* L.), kaba kekik (*Thymus serpyllum* L.), Suriye Kekiği (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii*), limon otu (*Lippia citriodora* L.), greyfurt kokulu nane (*Mentha x piperita* f.sp. *officinalis* L. var. 'Aura'), mercanköşk (*Origanum majorana* L), okaliptüs (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.), rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.), turunç (*Citrus aurantium* L.) ve çakşır (*Ferula communis* L.) gibifarklı bitki türlerine ait kurutulmuş yapraklarından ve tohumlarından daha önceden bildirildiği şekilde Neo-Clevenger tipi uçucu yağ çıkartma aletinin yardımı ile 3 saatlik buhar distilasyonu ile elde edilmiştir (Soylu ve ark., 2010). Elde edilen uçucu yağlar kimyasal bileşenleri ve antifungal etkinlikleri araştırılncaya kadar içerisinde anhydrous sodyum sülfat bulunan koyu renkli cam şişelerde 4 °C de saklanmıştır.

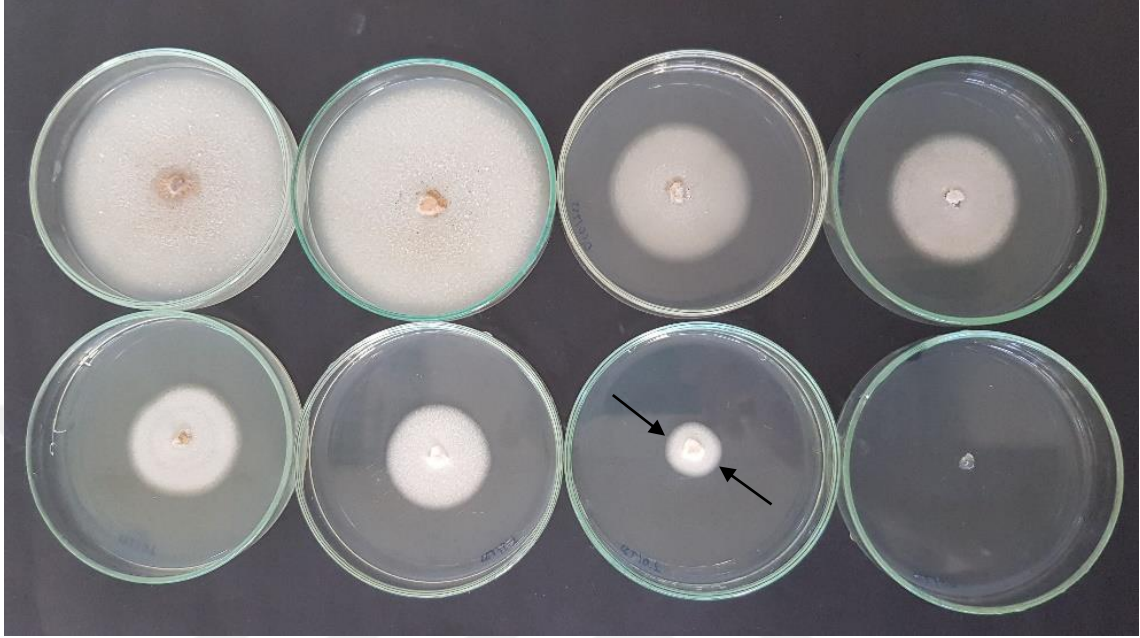
3.2.1.2. Bitki Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenlerinin GC/MS ile Belirlenmesi

Antifungal etkinlikleri araştırılan uçucu yağların kimyasal uçucu bileşenleri TR-5MSkolona (%5 phenyl-polisilfenilenesiloxan, 30 m x 0.25 mm iç çaplı, 0.25 film kalınlığı) sahip Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopicihazı (Thermo Scientific Focus) kullanılarak analiz edilmiştir. Cihazın analiz şartları; taşıyıcı gazı 1 mL/dakika akış hızına sahip Helyum (%99.9); iyonlaşma enerjisi 70 eV ve kütle aralığı m/z 50-650 amu olarak ayarlanmıştır. Kütle spektrometresinin transfer hattı ve enjeksiyon bloğu giriş sıcaklığı 220 °C olarak belirlenmiş ve örneklerin enjeksiyonu 250 split oranı olarak seçilmiştir. Uçucu yağ örneklerinin GC/MS cihazına enjeksiyon hacmi 1 mL'dir. Cihazın fırın sıcaklığı 3 °C/dk artışla 50- 220 °C aralığında programlanmıştır. Her bir bileşenin oluşturduğu spektrumlar, GC-MS'te Wiley 9 kütüphanesi ile eşleştirilmeleri sonucu tanımlanmıştır (Adams, 2001). Veriler Xcalibur yazılımı kullanılarak işlenmiştir (Kara ve ark., 2022).

3.2.1.3. Bitki Uçucu Yağların *Colletotrichumkarstii*'ye Karşı *in vitro* Antifungal Etkilerinin Belirlenmesi

Bitkiuçucu yağların fungal etmen *C. karstii*'nin misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan buhar fazındaki antifungal etkinliği, 20 ml genel fungus besiyeri olan Patates Dekstroz Agar (PDA) içeren 90 mm çapında 100 ml hava hacimli steril petri kaplarında araştırılmıştır (Soylu ve ark., 2010). İçerisinde 20 ml steril PDA besi yeri bulunan petri kabının orta noktasına 5 günlük taze *C. karstii* kültüründen mantar delici ile alınan 6 mm çapındaki diskler, miselli yüzeyi PDA ile temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra petri kapaklarına çalışmalarda antifungal etkinlikleri araştırılacak olan uçucu yağların farklı konsantrasyonları (0.25-200.0 µl/petri) mikro pipet yardımı ile damlatıldıktan sonra petri kabının kenarları parafilm (2-3 kez) ile kapatılıp, ters çevrilerek (kapak altta kalacak şekilde) 25 °C de inkübatörler (VELP, 220İ) içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak aynı şekilde inoküle edilmiş petri kapaklarına uçucu yağ yerine aynı miktarda steril su damlatılarak benzer işlemler uygulanmıştır. Uçucu yağların antifungal etkinliklerinin değerlendirmeleri, kontrol olarak kabul edilen petrilere fungus gelişimi petriyi tamamen kapladığı zaman,

uygulama yapılmış tüm petrilerdeki fungal koloni çaplarının ölçülmesiyle hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Uçucu yağın farklı konsantrasyonların buhar fazında *C. karstii*'nin misel gelişimi üzerine antifungal etkinliğinin belirlenmesi. Petri kaplarında artan uçucu yağ konsantrasyona bağlı misel gelişiminde gözlenen küçülmeler (ok)

Her bir uçucu yağın farklı konsantrasyonlarında antifungal etkinliği (engelleme oranı), (%) Abbott formülüne göre hesaplanmıştır. Denemelerde her petri 1 tekerrür ve her uçucu yağın farklı konsantrasyonları 3 tekerrür olacak şekilde Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre kurulmuş, her deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

3.2.1.4. Bitki Uçucu Yağların *Colletotrichumkarstii*'nin Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Etkinliğinin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi

Antifungal etkinliği araştırılan uçucu yağların buhar fazında misel gelişimini tamamen engelleyen minimum engelleme konsantrasyonlardaki (MIC) antifungal etkinliğinin fungisidal veya fungistatik özellikte olup olmadığını belirlemek amacıyla; herhangi bir gelişme kaydedilmeyen misel disklerin bulunduğu uçucu yağ damlatılmış petrilerin kapağı steril başka bir petri kapakla değiştirilerek parafilm sarılmadan 25°C' de tekrar 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Söz konusu MIC değerlerinde gelişme

göstermeyen misel diskleri kapak değişimini müteakiben PDA besiyeri üzerinde, gelişim göstermemesi söz konusu MIC değerinde uçucu yağın antifungal etkisi **fungisidal**(tamamen engelleyen, öldürücü), misel gelişiminin tekrar başladığı MIC değerlerinde ise uçucu yağın antifungal etkisi **fungistatik** (geçici) olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Uçucu yağın farklı konsantrasyonların buhar fazında *C. karstii*'nin misel gelişimi üzerine fungisidal etkinliğinin belirlenmesi

3.2.1.5. Bitki Uçucu Yağlarının Fungus Hif Yapılarında Sebep Olduğu Morfolojik Değişiklerin Belirlenmesi

Çalışmada nispeten yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösteren kekik (*T. spicata* var. *spicata*), Suriye kekiği (*O. syriacum*) ve rezene (*F. vulgare*) ve limon otu (*L. citridora*), uçucu yağların buhar fazında misel gelişimini tamamen engelledikleri fungisidal MIC dozlarında (4.0, 6.0 ve 10.0 µl/petri) misel yapıları üzerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikler Nomarski DIC ataçmanlarla donatılmış ışık mikroskobu (OLYMPUS BX-51, Japan) altında incelenmiştir. İçerisinde 20 ml PDA içeren petri

kutularına 5 günlük fungus misel diski konulduktan sonra 3 gün ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 3. gününde petrilerin kapaklarına kekik (*T. spicata* var. *spicata*), Suriye kekiği (*O. syriacum*), rezene (*F. vulgare*) ve limon otu (*L. citridora*) uçucu yağların buhar fazında misel gelişimini tamamen engelledikleri fungisidal MIC dozları (4.0, 6.0 ve 10.0 µl/petri) konulduktan sonra petriler parafilm ile kapatılmış ve tekrar 3 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerin kapakları açıldıktan sonra önceden gelişmiş fungus misellerinin uç kısımlarında mikroskopik gözlemler yapılarak fungus hifleri üzerindeki morfolojik değişiklikler fotoğraflanmak suretiyle kaydedilmiştir.

3.2.2. Antagonist Bakteri İzolatları *Colletotrichumkarstii*'ye Karşı *in vitro* Antagonistik Etkinlikleri, Antagonistik ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi

Antagonist bakteri (endofit ve epifit) izolatlarının antifungal etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalarda fungal etmenin kültüre alındığı Patates Dekstrozu Agar (**PDA**) ile aday endofit veya epifit bakteriyel izolatların kültüre alındığı seçici besi yerlerinden King B Agar(**KB**), genel besi yerlerinden Nutrient Agar (**NA**), Tryptic Soybean Agar (**TSA**) ve Luria Broth (**LB**) gibi besi yerleri kullanılmıştır. Antagonist bakteri izolatların *in vitro* etkinlik mekanizmalarının belirleneceği özel besi ortamları ise daha önceden bildirilmiş uygun yöntemlere göre karışım şeklinde hazırlanıp otoklav edildikten sonra kullanılmıştır.

3.2.2.1. Epifitik ve Endofitik Antagonist Bakterilerin İzolasyonu

Hastalık etmeni *Colletotrichumkarstii*'ye karşı biyokontrol etkinliği araştırılacak olan antagonist bakteri izolatları Erzin ve Arsuz ilçelerinde yetişen sağlıklı turuncgil ve avokado ağaçlarının kök, dal ve sürgün, yaprak ve meyvelerden izole edilmiştir (Şekil 3.3). Etkili epifitik ve endofitik antagonist bakteri izolatların elde edilmesi amacıyla özellikle antraknoz hastalığının belirtilerinin gözlemlendiği bahçelerdeki sağlıklı ağaçlardan güdümlü örneklemeye yapılmış ve bu dokulardan bakterilerizole edilmiştir (Aktan, 2018).

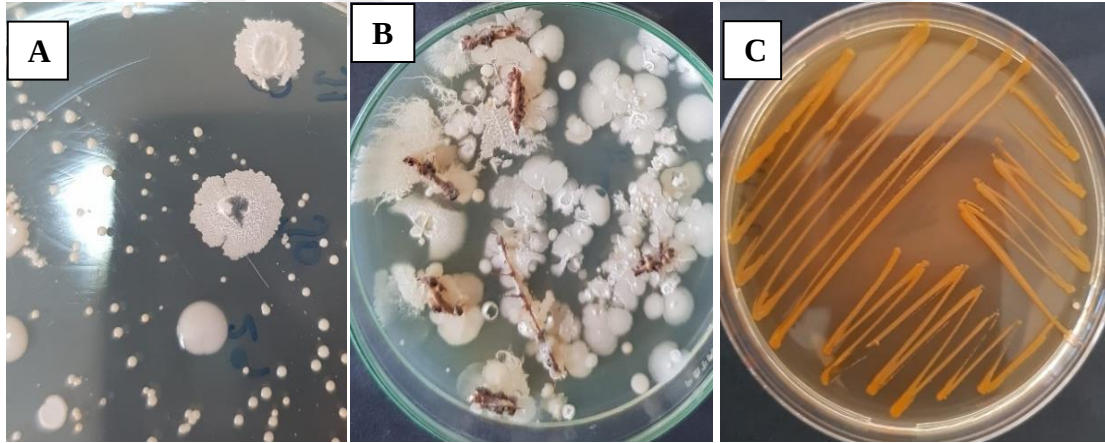


Şekil 3.3. Hastalık etmeni *C. karstii*'ye karşı biyokontrol etkinliği araştırılan antagonist bakteri izolatların izole edilmesinde kullanılan sağlıklı turunçgil ve avokado örnekleri

Endofit bakteriler hastalığın gözlemlendiği bahçelerdeki hastalıklı ağaçlar veya yakınındaki sağlıklı ağaçların farklı bitki kısımlarının iç dokularından etil alkol-sodyum hidroksit-etil alkol dezenfeksiyon yöntemi kullanmak suretiyle izole edilmiştir. Sağlıklı bitki dokuları öncelikle akan çeşme suyu altında yıkanmış, daha sonra %70'lik etil alkolde 3 dakika, %2'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda 2 dakika ve tekrar %70'lik etil alkolde 2 dakika olmak üzere 3 kez dezenfeksiyon işlemi uygulanmıştır. Dezenfekte edilen dokular daha sonra 5 defa steril saf su ile yıkanarak yüzey dezenfeksiyonu işlemi tamamlanmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan bitki kısımları steril 0.05 mM $MgCl_2$ tampon çözeltisi içeren steril eppendorf içerisinde iyice ezilip, elde edilen süspansiyonun seri sulandırma sonrası 5. ve 6. sulandırmadan 200 μ l alınarak özellikle seçici KB besi yerine bağıtle yayılarak ekimleri yapılmıştır. Endofitler ayrıca imprint (baskılama) yöntemi ile sağlıklı sürgün, meyve, kazık kök gibi dokuların aseptik olarak ikiye bölündükten sonra iç yüzeyleri doğrudan besi yerine temas ettirilmek suretiyle de izole edilmiştir (Aktan, 2018).

Sağlıklı bitki materyalinden epifit bakterilerin izolasyonu için; 10 gr ağırlığında etrafında kuru toprak bulunan sağlıklı bitki kök parçacıkların (1-2 cm boyunda) bulunduğu rizosfer bölgesinden veya sürgün, yaprak ve meyve gibi filosfer bölgesindeki sağlıklı dokulardan herhangi bir ön dezenfeksiyon işlemine tutulmaksızın doğrudan içerisinde 90 ml steril 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi bulunan steril cam erlenlere konulup, 30 dak. 200 rpm orbital çalkalayıcı içerisinde çalkalamaya bırakılmıştır. Daha sonra oluşan süspansiyon eppendorf içinde seri olarak sulandırıldıktan sonra, 10⁵ ve 10⁶ tüplerinden alınan 100 µl süspansiyon seçici KB besi içeren petri kaplarına bagetle yayılmıştır.

Her iki şekilde inokulasyonu yapılmış petriler 26 °C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Seçici besi yerlerinde gelişen morfolojik olarak birbirinden farklı görülen bakteri kolonilerinden (Şekil 3.4) bitki örneğini/bölgeyi temsil edecek sayıda tek koloniden saflaştırılma yapılarak teşhis ve etkinlik çalışmalarda kullanılmak üzere uygun besi yeri içeren petri kabında (6 cm) veya eğik Agarda +4 °C de kısa süreli veya steril Gliserol (%40) içeren Cryo Eppendorf tüpler içerisinde -80 °C de uzun süreli saklanmıştır.



Şekil 3.4. Sağlıklı turunçgil/avokado dokularından izole edilen aday endofit (A), epifit bakteri kolonileri (B) ve bu kolonilerden saflaştırılan ve denemelerde kullanılan saf bakteri izolat kültürleri(C)

3.2.2.2. Antagonist Bakteri İzolatların Biyo-Etkinlik Çalışmaları İçin Seçimi

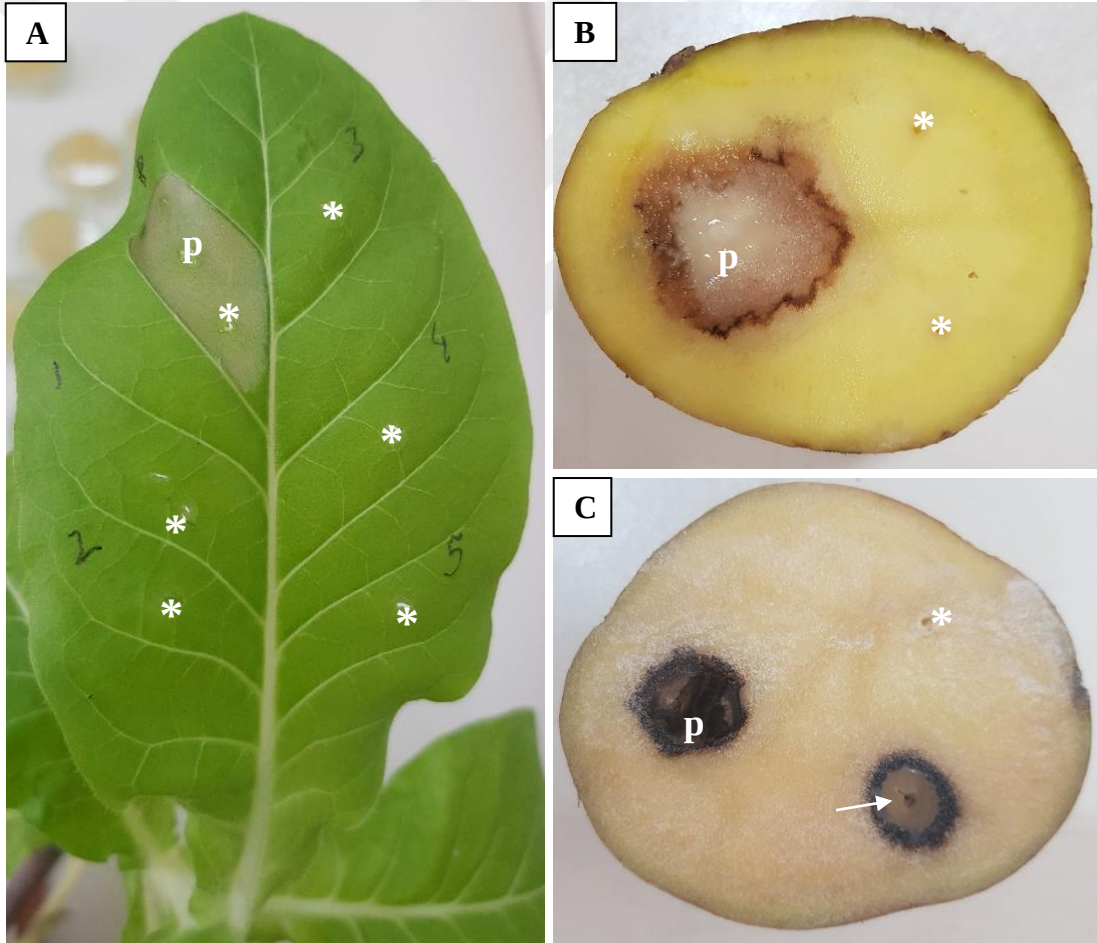
Fungal hastalık etmenine karşı antifungal etkinliği araştırılacak aday endofit ve epifit bakteri izolatlarının denemelere başlamadan önce bitki patojeni olup olmadığının belirlenmesi amacıyla tütün yapraklarında ve patates yumrularında herhangi bir hastalık belirtisine/reaksiyona neden olmaması esastır (Lelliot ve Stead, 1987).

Farklı konukçu bitkilerinden elde edilen aday epifit ve endofit bakteri izolatların, bitki patojeni olup olmadığını belirlenmesi amacıyla tütün bitkisinde aşırı duyarlılık (HR, Hypersensitive Reaksiyon) ve patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük testlerine tabi tutulmuştur. Tütünde HR testi için, aday epifit ve endofit bakteri izolatları ve daha önceden tanılanmış ve patojen olduğu teyit edilmiş bitki patojeni izolatın (*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* Pph12 izolatı) 48 saatlik kültüründen 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi içinde bakteri süspansiyonu (10⁸ hücre/ml) hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonları daha sonra steril enjeksiyon (1 ml hacimli) ile 8 haftalık sağlıklı tütün (*Nicotiana tobaccum* L.) yaprağının alt yüzeyinden damar aralarına gelecek şekilde 50 µl enjekte edilmiştir. Tütün yaprağına inokulasyonunda, izolatlar arasında bir damar boşluk bırakılarak, her bakteri izolatı bir damar arasına gelecek şekilde inokule edilmiştir. Tütün yaprağına inokule edilen bakteri süspansiyonları tarafınca inokule edilen alanlarda 1-2 gün sonra oluşan nekrotik lezyon oluşumları test edilen izolatın bitki patojeni olduğunu göstermesi nedeniyle HR testi pozitif olarak kabul edilmiş ve biyoetkinlik çalışmalarında kullanılmamıştır (Şekil 3.5A).

Tütün yaprağında HR negatif reaksiyon gösteren aday bakterilerin ayrıca patates dilimi üzerinde yumuşak çürüklük testine tabi tutulmuşlardır (Lelliot ve Stead, 1987). Sağlıklı patates yumruları dilimlenmeden önce %3'lük çamaşır suyunda (NaOCl) 1 dakika süreyle dezenfekte edilmiş, sonra steril su ile yıkanmış, aseptik olarak kabukları soyulduktan sonra steril bistürü ile 3 cm kalınlığında dilimlenmiştir. Patates dilimler daha sonra tabanında steril nemli filtre kâğıdı içeren plastik saklama kaplarında steril petri kapakları üzerine yerleştirilmiştir. Patates dilimleri üzerinde steril kürdan ile açılan yaralara TSA besi yeri üzerinde gelişmiş 2 günlük taze bakteri kültüründen steril kürdan yardımıyla alınan bakteri hücresi bulaştırılmıştır. İnokulasyonu yapılan patates dilimlerinin bulunduğu plastik saklama kapları 26 °C inkübatörler içerisinde 2 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra, inokulasyon noktaları yumuşak çürüklük yönünden

incelenmiştir (Şekil 3.5B). Testlemelerde pozitif kontrol olarak, daha önceden yumuşak çürüklük belirtisi gösteren patates yumrularından izole edilmiş ve MALDI-TOF ile tanılanmış *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum* izolatı kullanılmıştır.

Farklı konukçu dokularından izole edilen aday epifit ve endofit bakteri izolatları arasında gerek Tütün yapraklarında HR, gerekse patates yumuşak çürüklüğü testinde negatif sonuç veren izolatlar son olarak insan patojeni olup olmadığı yönünde teste tabi tutulmuştur. Bu amaçla bakteri izolatları doğrudan TSA besi yerine çizildikten sonra 37 °C en az 48-72 saat inkübasyona bırakılmış, söz konusu şartlarda gelişmeyen bakteri izolatları insan patojeni olamayacağı yönde kabul edilip, biyo-etkinlik çalışmalarında aday bakteri izolatları olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Sağlıklı turunçgil/avokado dokularından izole edilen aday endofit bakteri izolatların (A) tütün yaprağında aşırı duyarlılık (HR) ve (B-C) patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük testi. Tütün ve patates dilimlerinin inokulasyon noktalarında (*) HR ve yumuşak çürüklük testinde negatif veya pozitif (ok) sonuç veren aday antagonistbakteri izolatları gösterir. P, Patojen izolatların reaksiyonunu gösterir

3.2.2.3. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Tanılanması

Tütün HR, patates yumuşak çürüklük testi ve 37 °C negatif sonuç vermiş olan aday bakteri izolatların tür teşhisleri MALDI-TOF cihazı (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) ve bu cihaz için geliştirilen yöntem kullanılmıştır (Aktan ve Soylu, 2020). Saf kültürden alınan ve TSA (Tryptic Soy Agar) besi ortamında 1-2 gün gelişen saf tek bakteri kolonisinden kürdan yardımıyla bir miktar bakteri kütlesi içerisinde 1 ml %70 ethanol içeren steril eppendorf tüplere eklenip bakteri süspansiyonu elde edildikten sonra vortex cihazında 1 dak. karıştırılmış, sonra karışım 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra altta kalan pellet tekrar 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek tüp içinde ethanol kalıntısı tamamen uzaklaştırılmış, oluşan pelletin oda sıcaklığında yaklaşık 5 dak bekletilmek suretiyle tamamen kuruması sağlanmıştır. Pellet kuruduktan sonra üzerine 30 µl %70 formik asit eklenmiş ve tüpler 13.000 rpm'de tekrar 1 dak. süreyle vortekslenmiştir. Vortekslenen tüplere bu kez 30 µl acetonitril eklendikten sonra 13.000 rpm'de 1 dakika vortekslenerek karışım iyice çözdürülmüştür. Son olarak süpernatant dan 1µl alınarak örnek plakasındaki (target) noktalara iki tekrarlı olacak şekilde mikropipetle eklenmiş, oda sıcaklığında yaklaşık 3-5 dak kuruması sağlanmıştır.

Kuruyan örneklerin üzerine son olarak 1 µl HCCA Matrix (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) solüsyonu eklenip örneklerin analiz için 2-3 dakika daha oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Daha sonra örnekler MALDI-TOF MS (Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) cihazına yüklenmiştir. Cihaz çalışma modunda bakteri protein ekstraktların iyonlaşması için gereken minimum lazer gücü olan 500 lazer ışını ile protein profillerinin ayrıştırılması sağlanmış, 2-20 kDa spektrum aralığındaki m/z (kütle/yük) protein profilleri cihazın Mikroorganizma kütüphanesi olarak BIOTYPER™ 1.1 software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kullanılarak kütüphanede yer alan tanılanmış bakteri türlerin profilleri ile karşılaştırılmak suretiyle tür tanılamaları yapılmıştır.

3.2.2.4. Antagonist Bakteri İzolatların *C. karstii*'nin Misel Gelişiminin Engellenmesi Üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Farklı türlere ait sağlıklı turunçgil ve avokado ağaçlarından elde edilip tanılması yapılmış aday bakteri izolatlarının hastalık etmenleri, *C. karstii* izolatının misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan antagonistik etkinliği önceden bildirildiği şekilde PDA+TSA (1:1, v/v) içeren petri kaplarında (90 mm çapında) ikili kültür testleriyle belirlenmiştir (Aktan, 2018). Kesin tür tanılması yapılmış, Tütün HR ve patates yumuşak çürüklük testlerinde negatif sonuç vermiş, insan patojeni olmadığı belirlenen aday endofit ve epifit bakteri izolatları, yüzeyi tamamen kuru olan besi yerine petrinin üst noktasından 2 cm gerisine çizildikten sonra ve 25 °C'de 2 gün süre ile ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inokulasyondan 2 gün sonra, besi ortamında çizgi şeklinde gelişmiş bakteri noktasının 4 cm gerisine test edilecek 5 günlük fungal izolatın kültüründen alınacak 6 mm çaplı fungus misel diskleri yerleştirilmiştir (Şekil 3.6). Sadece fungal izolatın inokule edildiği kontrol petrilerine herhangi bir epifit ve endofit bakteri izolatı çizilmemiştir. Uygulama yapılan ikili kültür petrileri daha sonra parafilm ile kaplanarak, 25 °C'de 5-7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.6. Sağlıklı turunçgil/avokado dokularından izole edilen aday endofit bakteri izolatların fungal hastalık etmenin misel gelişiminin engellenmesinin belirlenmesinde kullanılan *in vitro* ikili kültür testi

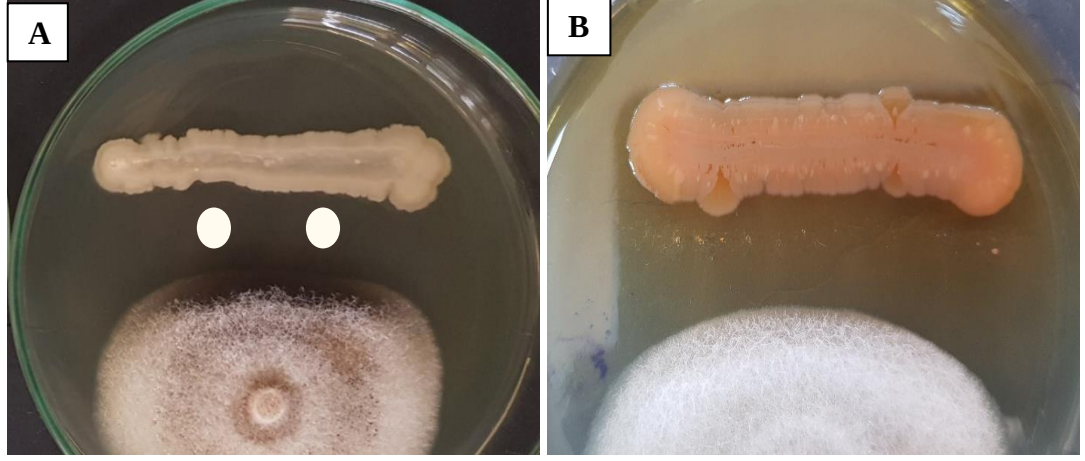
Kontrol petrilerinde patojenin petriyi tamamen kaplamasıyla birlikte, bakterilerin çizildiği ikili kültür petrilerinde bakteriye doğru gelişme gösteren fungal etmenlerin misel gelişimi (MGu) ölçülerek, kontrol petrilerdeki misel (MGk) gelişimine kıyaslanmak suretiyle antagonist bakterilerin misel gelişimini engelleme oranlarının %si ABBOT formülüne göre hesaplanmıştır (Ahmed ve ark. 1999).

Her bakteri-fungus kombinasyonu için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

3.2.2.5. Antagonist Bakteri İzolatların Fungal Etmenin Misel ve Sporları Üzerine Olan Antifungal Özelliklerinin Belirlenmesi

İkili kültür testlerinde fungal etmene karşıyüksek antagonist etkinlik gösteren bakterilerin engelleme bölgelerindeki antifungal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla fungus miseli ile bakteri arasında kalan engelleme bölgesi üzerine 3 günlük sağlıklı fungal misel diskleri (6 mm çapında) yerleştirilmiş ve 3-5 gün tekrar inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.7A). Engelleme bölgesinde misel diskingelişme gösterip göstermemesine göre antagonistin üretmiş olduğu antimikrobiyal bileşik(ler)in etkinliği “fungusidal” veya “fungistatik” olarak kayıt edilmiştir.

İkili kültür testlerinde fungal etmene karşıyüksek antagonist etkinlik gösteren bakterilerin engelleme bölgelerinde fungal etmenin spor çimlenmesi üzerine olan antifungal etkinliğinin belirlenmesi amacıyla, engelleme görülen bölgeye bakteri kolonisinden 1, 2 ve 3 cm uzaklığa 50 µl spor süspansiyonu (10^4 spor/ml) steril pamuklu kürdanla yayıldıktan sonra Petriler 25 °C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.7B). İnkübasyondan 24 saat sonra spor süspansiyonların konulduğu alanlarda ışık mikroskobu ile gözlemler yapılarak spor canlılık durumları ve çimlenme oranları kaydedilmiştir.



Şekil 3.7. Antagonist bakteri izolatların engelleme bölgesinde üretmiş oldukları bileşen(ler)in fungal etmenin misel (A) ve sporları (B) üzerine olan antifungal özelliklerinin belirlenmesi

Antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen kimyasal bileşenlerin engelleme bölgesine yakın noktalarda fungal etmenin hifleri üzerinde neden oldukları morfolojik değişiklikler doğrudan engellemelerin gözlemlendiği petrilerde (Şekil 3.8) ışık mikroskobu ile yapılan gözlemlerle belirlenmiştir.

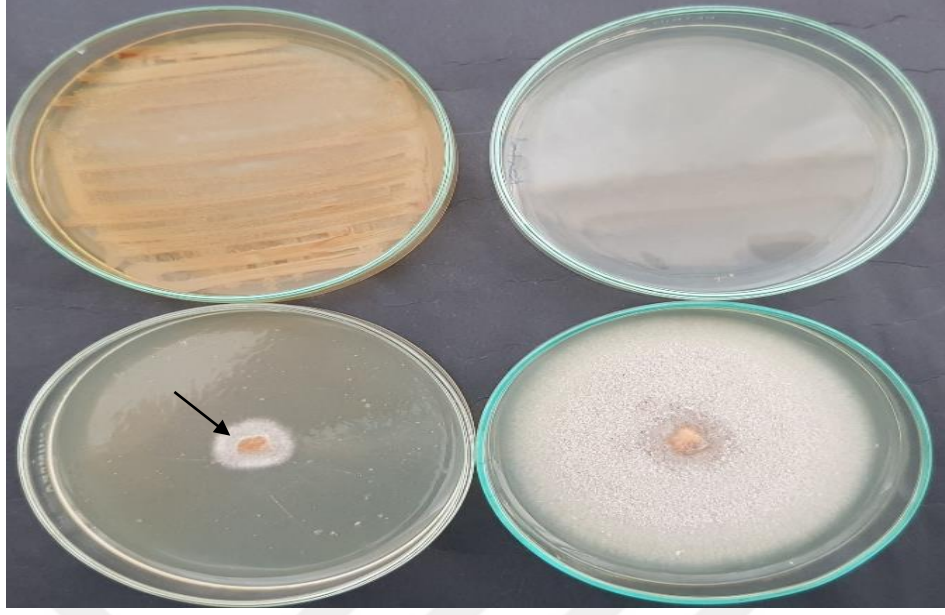


Şekil 3.8. Antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen kimyasal bileşenlerin engelleme bölgesine yakın noktalarda (daire içinde gösterilen) fungal etmenin hifleri üzerinde neden oldukları morfolojik değişiklikler (ok)

3.2.2.6. Antagonist Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin Misel Gelişimi üzerine Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

İkili kültür testlerinde Fungal etmene karşı yüksek antagonistik etkinlik gösteren bazı izolatların üretmiş oldukları uçucu bileşen(ler)inin fungusun misel gelişimini engelleme etkinlikleri “kapalı ikili kültür” yöntemi (sealed plate method) kullanılarak belirlenmiştir (Fiddaman ve Rossall, 1993). Petri kapaklarının birine PDA, diğerine TSA besi yeri dökülüp donduktan sonra bakteri izolatları, zig zak çizgi ekim yöntemi ile TSA besi yeri içeren petrinin üst kapağına çizilmiş, bakteri çizimi yapılan petrinin PDA içeren alt kapağına test edilen funguslardan alınan 3 günlük fungus misel diski(6 mm çap) yerleştirilmiş ve 2 petri kapağı birbirlerine bakacak şekilde kapatıldıktan sonra, kapaklarının kenarları parafilm ile sarılmak suretiyle oluşan uçucu bileşenlerin ortamdan uzaklaşması engellenmiştir. Kontrol petrilere herhangi bir bakteri izolatu çizilmemiştir. Uygulama sonrası petriler 25 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petrilere hastalık etmenin petriyi tamamen kaplamasını müteakiben (5-7 gün sonra) fungal etmenlerin misel gelişim çapları (MG_u) ölçülmüş (Şekil 3.9) olup, kontrol petrilere misel (MG_k) gelişme çaplarına göre engelleme oranlarının %si hesaplanmıştır (Ahmed ve ark. 1999).

Her bakteri-fungus kombinasyonu için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.



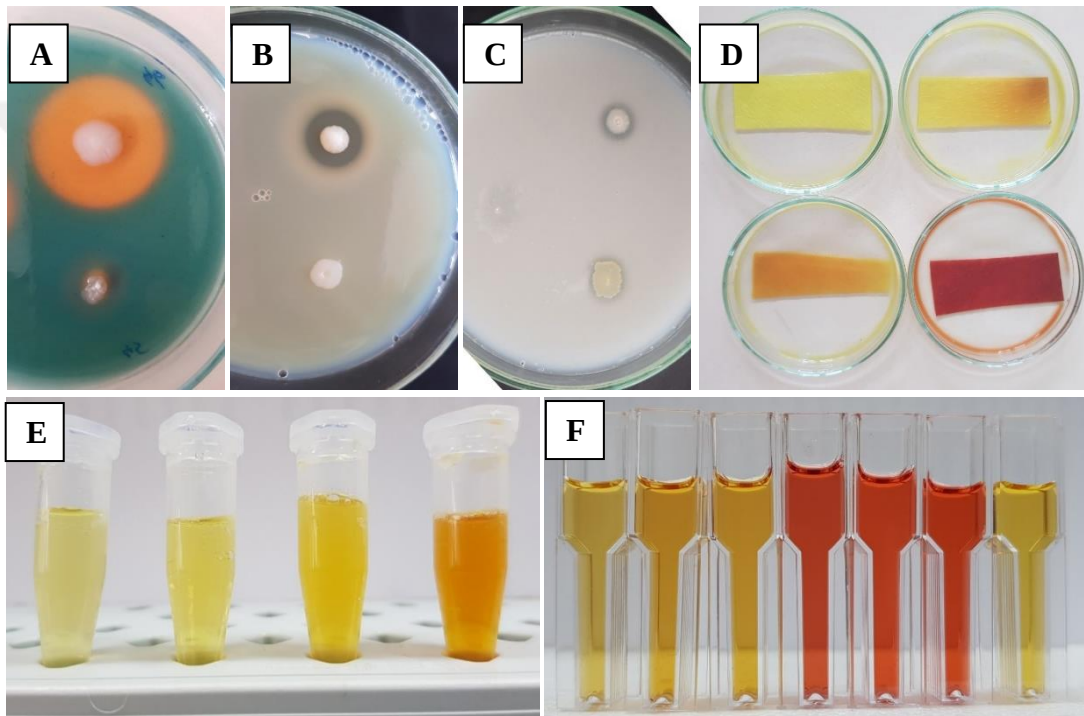
Şekil 3.9. Antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen uçucu bileşenlerin fungal etmenin misel gelişimini engelleme(ok) potansiyellerinin belirlenmesi

3.2.2.7. Antagonist Bakteri izolatlarının Siderofor ve Proteaz Üretme Potansiyelleri ile Fosforu Çözme Etkinliklerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının antagonistik etki mekanizmalarından “proteaz enzimi” ve “siderofor üretme” potansiyeli ile bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalardan biri olan “fosfor çözme” etkinliği bu mekanizmalara spesifik besi ortamları üzerinde belirlenmiştir (Şekil 3.10). Aday izolatların siderofor üretimi Schwyn ve Neilands (1987) tarafından bildirildiği şekilde içerisinde krom azurol S (CAS) boyası içeren besi yeri bulunan petrilerde (Şekil 3.10A); proteaz enzimi üretme potansiyelleri Perneel ve ark., (2007) tarafından bildirildiği şekilde %2 Skimmed Milk Powder(yağı alınmış süt tozu) (Merck, Darmstadt, Germany) içeren Luria Broth (SMLBA) besi yerleri üzerinde (Şekil 3.10B); fosfor çözme potansiyeli ise Kumar ve ark. (2012) tarafından bildirildiği şekilde, tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri içeren petrilerde belirlenmiştir (Şekil 3.10C).

Her 3 test için, test edilecek olan 2 günlük bakteri izolat kültüründen alınan bakteri inokulumu, SMLBA, CAS ve PVK besi yeri üzerine steril kürdan ile 3 farklı noktaya ekimleri yapıldıktan sonra, inokule edilmiş petriler 26 °C’de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 48 saat sonra proteaz için SMLBA ve fosfor çözme aktivitesi için PVK besi yeri üzerinde inokule edilmiş bakteri kolonisi etrafında

şeffaf bir zon (engelleme bölgesi) ile CAS besi yeri üzerine inokule edilmiş bakteri kolonisi etrafında sarı-turuncu renkte bir zon (engelleme bölgesi) oluşturup oluşturması yönünden incelenmiştir. Söz konusu petrilerde oluşan zonlar bakterinin proteolitik, siderofor ve fosfor çözme aktivitesi yönünden pozitif olarak kabul edilmiştir. Bakteri kolonisi etrafında oluşan zon çapının, bakteri koloni çapına bölünmesi suretiyle her izolat için siderofor (Sid-indeks), proteolitik (Pro-indeks) ve fosfor çözme (Fos-indeks) etkinlik indeksi hesaplanmıştır (Vazquez ve ark., 2000). Her bakteri izolatu için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.



Şekil 3.10. Antagonist bakteri izolatlarının siderofor (A), proteaz (B), fosforu çözme (C), hidrojen siyanür (D), amonyak (E) ve indol asetik asit (F) üretme potansiyellerinin belirlenmesi

3.2.2.8. Antagonist Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Farklı sağlıklı ağaçlardan izole edilmiş aday antagonist bakteri izolatlarının hidrojen siyanür (HCN) üretim potansiyelleri Castric (1977) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiştir. Aday antagonist bakteri izolatlarının 2 günlük taze kültürlerden steril kürdan yardımıyla alınan aday bakteri izolatları, 4.4 gr/L glycine eklenmiş TSA besi yeri (6 cm steril cam petrilerde) üzerine zig zak şeklinde tüm yüzeyi kaplayacak şekilde çizilmiştir. Petri kapağına 1x3 cm şerit halinde kesilmiş steril kaba filtre kağıdı yerleştirildikten sonra filtre kağıtları yaklaşık 0.5 ml %2 picric acid + %1 sodium carbonate (Na_2CO_3) süspansiyonu (100 ml steril su+2 gr PA+1 gr Na_2CO_3) ile ıslatılmıştır. Uygulama yapılmış tüm petri kapları kapatıldıktan sonra etrafı parafilm ile sarılarak, petriler 26 °C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Petri kabı kapağındaki filtre kağıdı renginin beyaz/açık sarı renkten kahverengi veya koyu kırmızıya dönüşmesi (Şekil 3.10D) ortamda HCN üretiminin oluştuğunu göstermiştir (Castric, 1977).

3.2.2.9. Antagonist Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH_3) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının antagonistik etkinlik mekanizmalarından biri olan amonyak (NH_3) üretme etkinlikleri Cappuccino ve Sherman, (2013) tarafından belirtildiği şekilde, peptonlusıvı besiyeri içerisine Nessler's çözeltisi eklenmek suretiyle belirlenmiştir (Şekil 3.10E). Test edilecek olan bakteri izolatlarının 48 saatlik taze kültüründen steril kürdan ile alınan inokulumu, içerisinde steril 5 ml peptonlu su içeren cam tüplere inokule edilmiştir. Bakteri ile inokule edilmiş tüpler 26 °C'de 150 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi yerinde gelişen bakteri süspansiyonu üzerlerine 250 µl Nessler's çözeltisi ilave edilmiştir. Besi yeri içerisinde bakterilerce oluşturulacak amonyak üretilip üretilmediği, Nessler's çözeltisi ilave edildikten sonra tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan kahverengi-koyu sarı renge dönüşmesiyle belirginleşmiştir.

3.2.2.10. Antagonist Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının IAA üretme potansiyelleri Glickman ve Dessaux, (1995) tarafından bildirildiği gibi Salkowski yöntemi kullanılmak suretiyle belirlenmiştir. *In vitro* misel gelişimini engelleme etkinlikleri göz önüne alınmış bölgeyi ve konukçu bitkiyi temsil edecek şekilde seçilmiş bakteri izolatlarının 48 saatlik taze kültürlerinden hazırlanan 500 µl bakteri süspansiyonu (10^8 hücre/ml konsantrasyondaki) 3 mg ml^{-1} L-tryptophan içeren 5 ml steril LB besi yerine inokule edilmiştir. İnokule edilmiş tüpler 26°C 'de 200 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 4 gün sonra, sıvı besi yerinde gelişen bakteriler 5000 rpm'de 30 dak. santrifüj yapıldıktan sonra üstte kalan supernatant'tan 1 ml alınarak steril eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine 40 µl fosforik asit ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış 1 ml bakteri hücre kültürleri, 2 ml Salkowski çözeltisi (150 ml %98'lik H_2SO_4 , 250 ml of distile H_2O , 7.5 ml of 0.5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) bulunan steril cam tüplere aktarılacak ve 25°C 'de karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. L-tryptophan içermeyen besi yeri kontrol uygulama olarak değerlendirilmiştir.

Bakteriler tarafından ortam içerisinde oluşturulan IAA miktarı, tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan kırmızı-pembe renge dönüşmesiyle belirginleşmiştir (Şekil 3.11F). Bakteriler tarafınca oluşturulan IAA miktarı 535 nm dalga boyuna ayarlı UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lambda 25, USA) kullanılarak kantitatif olarak ölçülmüştür (Patten ve Glick, 2002). Ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri daha sonra, bilinen IAA (Merck, Darmstadt, Germany) çözeltisi ile hazırlanan IAA konsantrasyon standart eğrisiyle karşılaştırılmak suretiyle $\mu\text{g ml}^{-1}$ (ppm) düzeyine dönüştürülmüştür.

3.2.3. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Tüm *in vitro* denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, patojen gelişiminin engellenme oranları %oranlarına çevrilmeden SPSS istatistik programı (SPSS Statistics 17.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılarak izolatlar arasındaki farklılık Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile tespit edilmiştir ($P \leq 0.05$). Uçucu yağların farklı konsantrasyonlarda misel gelişimini %50 düzeyinde engelleyen etkili konsantrasyonları (EC_{50}) her bir kimyasal için farklı konsantrasyonlarda elde edilen değerleri kullanılarak SPSS istatistik programı (Versiyon 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bitki Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenleri

Antifungal etkinliği belirlenen bitki uçucu yağların kimyasal bileşenleri, Gaz Kromatografi/kütle spektrometresi (GC/MS) ile belirlenmiştir. GC-MS analizine göre, antifungal etkinliği araştırılan uçucu yağlardan en fazla bileşenin mercanköşk (*O. majorana*) uçucu yağında 45 adet olarak belirlenmiş olup bu yağı sırasıyla, 44 farklı bileşenle rezene (*F. vulgare*) uçucu yağı, 39 farklı bileşenle yabani kekik (*T. serpyllum*), okaliptus (*E. camaldulensis*) ve greyfurt kokulu nane (*M. aura*) uçucu yağları, 37 farklı bileşenle Suriye kekiği (*O. syriacum*) uçucu yağı, 36 farklı bileşenle çakşır (*F. communis*), 35 farklı bileşenle limon otu (*L. citridora*) uçucu yağı, 34 farklı bileşenle karabaş kekiği (*T. spicata spicata*) uçucu yağı izlemiş olup, en az kimyasal bileşen ise toplam 21 ana bileşenin bulunduğu tespit edilen turunç (*C. aurantium*) uçucu yağı olmuştur (Çizelge 4.1).

Uçucu yağların ana bileşenleri yapılan GC-MS analizleri ile belirlenmiş olup, terpinen-4-ol (%21.58) *O. majorana* uçucu yağının, trans-anethole (%67.2) *F. vulgare* uçucu yağının, thymol (%14.99) ve cymene (%14.98) *T. serpyllum* uçucu yağının, bir diğer adı 1,8 cineole olan eucalyptol (%75.69) *E. camaldulensis* uçucu yağının, linalool (%57.86) *M. aura* uçucu yağının, carvacrol (%23.93) ve γ -terpinene (%21.33) *O. syriacum* uçucu yağının, α -pinene (%65.33) *F. communis* uçucu yağının, limonene (%24.64) ve e-citral (%23.09) *L. citridora* uçucu yağının, carvacrol (%61.32) *T. spicata* uçucu yağının, limonene (%94.36) ise *C. aurantium* uçucu yağının içinde en yüksek oranda bulunan ana bileşenler olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Antifungal etkinlikleri belirlenen bitki uçucu yağlar ve ana bileşenleri

Uçucu yağ	Bileşen Sayısı	Belirlenen ana bileşenler ^a
<i>Origanum majorana</i> L.	45	terpinen-4-ol (%21.58), <i>trans</i> -sabinene hydrate (%8.65), γ -terpinene (%8.36)
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	44	<i>trans</i> -anethole (%67.2), estragole (%10.3), limonene (%9.1)
<i>Thymus serpyllum</i> L.	39	thymol (%14.99), cymene (%14.98), γ -terpinene (%12.71),
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.	39	eucalyptol (%75.69), limonene (%5.49), α -pinene (%5.16)
<i>Mentha x piperita</i> f.sp. <i>officinalis</i> var. 'Aura'	39	linalool (%57.86), linalyl acetate (%29.76), α -terpineol (%3.69)
<i>Origanum syriacum</i> L. var. <i>bevanii</i>	37	carvacrol (%23.93), γ -Terpinene (%21.33), thymol (%20.64)
<i>Ferula communis</i>	36	α -pinene (%65.33), β -pinene (%8.0), γ -gurjunene (%6.93)
<i>Lippia citriodora</i> L.	35	limonene (%24.64), e-citral (%23.09), z-citral (%18.63)
<i>Thymbra spicata</i> var. <i>spicata</i> L.	34	carvacrol (%61.32), γ -terpinene (%28.53), o-cymene (%5.2)
<i>Citrus aurantium</i> L.	21	limonene (%94.36), myrcene (%0.65), limonene oxide (%0.56)

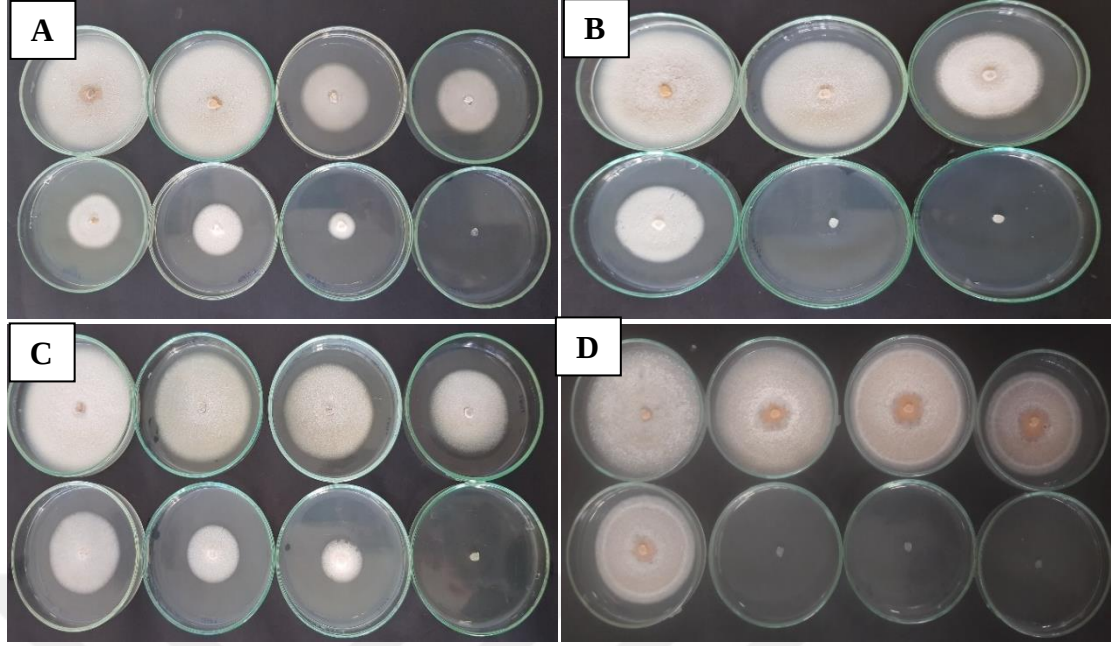
^a GC-MS tarafından belirlenen toplam bileşen sayısı ve ilk 3 sıralamaya giren ana bileşenler.

Çalışmada kullanılan uçucu yağların ana bileşenleri ve yağ içerisinde bulunuş miktarları daha önce aynı bitki türleri için belirlenen sonuçlarla büyük oranda benzerlik göstermiş olup, toplam belirlenen kimyasal sayısı ve oranlarında kısmen farklılıklarda bildirilmiştir (Cavanagh ve Wilkinson, 2002; Khan ve Saeed, 2002; Minija ve Thoppil, 2002; Bouzouita ve ark., 2005; Soylu ve ark., 2006; Kadri ve ark., 2011). Gerek çalışmalarımızda gerekse farklı araştırmacıların önceden yapmış oldukları çalışmalarda Lamiaceae familyasına dahil bitkilerin uçucu yağlarında yüksek düzeylerde carvacrol, camphor, eucalyptol (1,8-cineole) ve thymol gibi bileşenlerin bulunduğu konusunda bildirimler bulunmaktadır. Ülkemizin farklı bölgelerinde yetişen ve çalışmalarımızda da kullanılan benzer bitkilerle yapılan çalışmalarda *Melissa officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus serpyllum* ve *Lavandula stoechas* bitki uçucu yağlarının; *O. majorana* bitki uçucu yağının; *T. serpyllum*, *R. officinalis*, *Salvia officinalis* ve *O. majorana* bitki uçucu yağlarının kimyasal bileşenlerinin türlere bağlı olarak farklılık gösterdiğini, her türün içerdiği ana bileşenlerinin kısmende olsa değişen oranlarında

GC-MS ile belirlemişlerdir (Tabanca ve ark., 2004; Topal ve ark., 2008; Arslan ve Derviş, 2010). Söz konusu yapılan çalışmalarında *Thymus serpyllum*'un ana bileşeninin thymol (Arslan ve Derviş, 2010), *Origanum majorana*'nın ana bileşeninin terpinene-4-ol (Tabanca ve ark., 2004; Hussain ve ark., 2011), *Rosmarinus officinalis*'in ana bileşeninin eucalyptol (1,8-cineole) (Kadri ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012), *Salvia officinalis*'in ana bileşeninin ise camphor olduğu (Sokovic ve ark., 2010; Khalil and Li, 2011) bildirilmiştir. Uçucu yağların kimyasal kompozisyonlarındaki farklılıkların nedeni olarak, bitkinin yetiştiği ülke, toprak, coğrafi yapısı, toplandığı yükselti, bitki yaşı ve çıkarıldığı bitki kısmına bağlı olarak değişiklik gösterdiği önceden yapılmış birçok çalışmada rapor edilmiştir (Türkmen ve ark., 2022).

4.2. Bitki Uçucu Yağların Fungal Etmenin Misel Gelişiminin Engellenmesi Üzerine *in vitro* Antifungal Etkilerinin Belirlenmesi

Farklı bitki uçucu yağların buhar fazında *Colletotrichum karstii*'nin misel gelişimini engellemesi üzerine olan antifungal etkinlik sonuçları Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ile Şekil 4.1 verilmiştir. Elde edilen minimum engelleme konsantrasyon (MIC) değerlerine bakıldığında en etkili uçucu yağın, 4.0 µl/petri dozla *T. spicata*, *O. Syriacum* (Şekil 4.1A) ve *T. serpyllum* bitkilerin yapraklarından elde edilen uçucu yağlarının olduğu, bu bitki uçucu yağlarını sırasıyla 6.0 µl/petri dozla *F. vulgare* bitkisinin tohumlarından elde edilen uçucu yağı (Şekil 4.1B), 10.0 µl/petri dozla *L. citridora* (Şekil 4.1C), 15.0 µl/petri dozla *M. aura*, 20.0 µl/petri dozla *O. majorana* bitkilerinin yapraklarından elde edilen uçucu yağlar izlemiştir. Denemelerde kullanılan okaliptüs (*E. camaldulensis*) ve turunç (*C. aurantiium*) yapraklarından elde edilen uçucu yağlar, diğer uçucu yağlara kıyasla 60.0 (Şekil 4.1D) ve 175.00 µl/petri gibi oldukça yüksek dozlarda antifungal etkinlik gösterirken, çakşır (*F. communis*) bitki uçucu yağı test edildikleri tüm dozlarda (100 µl/petri) fungal etmenin misel gelişimini engellemede etkili olamamıştır. Yapılan istatistik analiz sonucunda aynı uçucu yağa ait farklı konsantrasyonların yanı sıra aynı dozda kullanılan farklı uçucu yağlar arasında kayıt edilen antifungal etkinliklerin istatistiksel olarak önemli düzeylerde farklı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3).



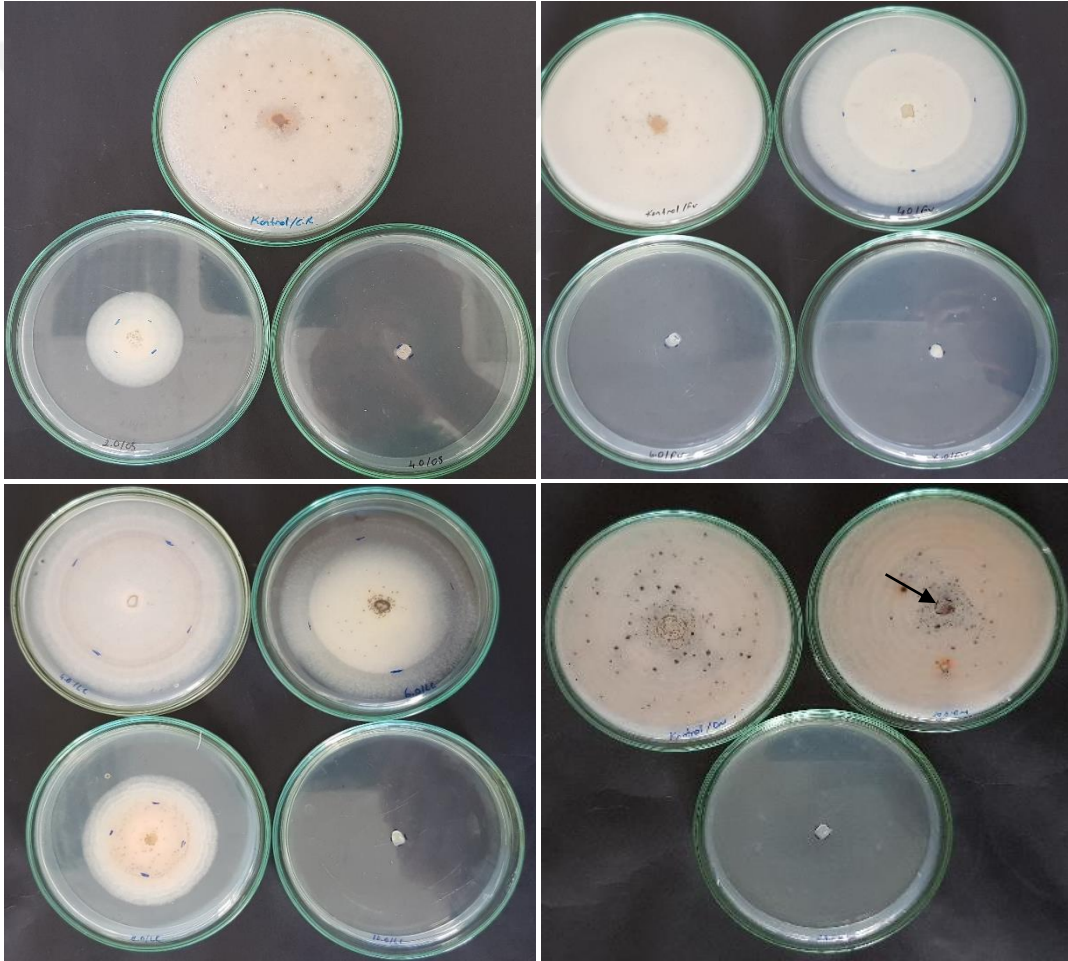
Şekil 4.1. Farklı bitki uçucu yağların buhar fazında *Colletotrichum karstii*'nin misel gelişimini engellemesi üzerine olan antifungal etkinlikleri. (A) *O. syriacum*, (B) *F. vulgare*, (C) *L. Citridora* ve (D) *E. camaldulensis* uçucu yağlarının farklı dozlarda misel gelişimini engelleme potansiyellerini göstermektedir.

Uçucu yağlardan özellikle Labiateae familyasına dahil bitkilerden elde edilen uçucu yağların etkinliğinin oldukça güçlü olduğu, bu bitkiler arasında özellikle kekik (*Thymbra spicata*, *Thymus serpyllum* ve *Origanum syriacum*) ile Umbelliferafamilyasından olan rezene (*F. vulgare*) bitki uçucu yağları tarafından gösterilen antifungal etkinliğin dikkat çekici bir şekilde 4-6 µl/petri gibi oldukça düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu görülmektedir. Diğer Labiateae familyasına giren limon otu (*L. citridora*), mercanköşk kekiği (*O. majorona*) ve nane gibi bitki uçucu yağlarının etkinliğinin 2-5 katı daha yüksek dozlarda fungal etmenin misel gelişimini %100 oranında engelleyebildiği gözlenmiştir.

Söz konusu uçucu yağların kullanıldıkları dozlardaki misel engelleme oranları kullanılarak yapılan Probit analiz sonucunda uçucu yağların fungus misel gelişimini %50 oranında engelleyen etkili konsantrasyon (EC₅₀) değerleri, *T. spicata* için 0.857 µl/petri, *O. syriacum* için 0.981 µl/petri, *T. serpyllum* için 1.71 µl/petri, *F. vulgare* için 2.146 µl/petri, *L. citridora* için 3.154 µl/petri, *M. aura* için 7.236 µl/petri, *O. majorona* için 9.238 µl/petri olarak, *E. camaldulensis* için 56.832 µl/petri hesaplanırken, en yüksek EC₅₀ değeri *C. aurantium* için 99.0 µl/petri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çakşır (*F. communis*) uçucu yağının test edilen tüm dozlarda engelleme gözlenmemesi nedeniyle bu yağ için EC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.

Test edilen uçucu yağlar arasında *O. majorona* uçucu yağı dışında tüm uçucu yağların fungus miselini %100 oranında engelleyen en düşük konsantrasyonlarda (MIC) [4.0 µl/petri dozlarında *T. spicata*, *O. syriacum* ve *T. serpyllum* uçucu yağları; 6.0 µl/petri dozda *F. vulgare* uçucu yağı; 10.0 µl/petri dozda *L. citridora* uçucu yağı; 15.0 µl/petri dozda *Mentha x piperita* f.sp. *officinalis* var. 'Aura' uçucu yağı; 60.0 µl/petri dozda *E. camaldulensis* uçucu yağı; 175 µl/petri dozda *C. aurantiium* uçucu yağı] antifungal etkinliklerinin “**fungusidal**” özellikte olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *O. syriacum* (A), *F. vulgare* (B), *L. Citridora* (C) ve *O. majorona* (D) uçucu yağının misel gelişimini tamamen engelleyen MIC değerlerinde fungistatik ve fungusidal etkinlikleri. *O. Syriacum* 4.0 µl/petri, *F. vulgare* 6.0 µl/petri, *L. citridora* 10.0 µl/petri MIC değerlerinde fungusidal (ok) etkinlik gösterirken, *O. majorona* uçucu yağı 20.0 µl/petri dozundaki MIC değerinde fungistatik (ok), 25.0 µl/petri dozunda fungusidal etkinlik göstermiştir.

Çizelge 4.2. Farklı dozlarda kullanılan uçucu yağların antaknoz hastalık etmeni *C. karsti*'nin misel gelişiminin (mm) engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği

Bitki Uçucu yağların misel gelişimi (mm) üzerine etkisi										
Dozlar(μl)	Tss	Os	Tsy	Fv	Lc	Ma	Om	Ec	Ca	Fc
0.00	90.00g	89.33g	90.00e	89.67i	90.00l	90.00g	90.00h	90.00d	90.00i	90.00e
0.25	88.33g	79.00f	90.00e	88.67i	86.00k	90.00g	90.00h	90.00d	90.00i	90.00e
0.50	52.00f	79.67f	90.00e	83.33h	77.00j	90.00g	90.00h	90.00d	90.00i	90.00e
0.75	47.67e	57.00e	87.00e	78.67g	73.67i	90.00g	90.00h	90.00d	90.00i	90.00e
1.00	42.00d	46.00d	71.33d	74.67f	68.33h	90.00g	90.00h	90.00d	90.00i	90.00e
1.50	32.00c	30.00c	58.33c	63.67e	64.67g	90.00g	90.00h	90.00d	90.00i	90.00e
2.00	17.67b	15.33b	41.67b	49.0d	62.00f	90.00g	90.00h	90.00d	90.00i	90.00e
4.00	0.00a	0.00a	0.00a	32.0c	51.33e	78.67f	82.33g	90.00d	90.00i	90.00e
5.00	0.00a	0.00a	0.00a	13.33b	43.00d	67.00e	71.67f	90.00d	90.00i	90.00e
6.00	nt	nt	nt	0.00a	36.00c	54.33d	65.00e	90.00d	90.00i	90.00e
8.00	nt	nt	nt	0.00a	27.33b	45.33c	59.67d	90.00d	90.00i	90.00e
10.00	nt	nt	nt	nt	0.00a	30.67b	54.33c	90.00d	90.00i	90.00e
15.00	nt	nt	nt	nt	0.00a	0.00a	18.00b	90.00d	90.00i	90.00e
20.00	nt	nt	nt	nt	Nt	0.00a	0.00a	90.00d	90.00i	90.00e
25.00	nt	nt	nt	nt	Nt	nt	0.00a	90.00d	90.00i	90.00e
30.00	nt	nt	nt	nt	Nt	nt	0.00a	90.00d	90.00i	90.00e
40.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	78.67c	90.00i	90.00e
50.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	68.67b	90.00i	90.00e
60.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.00a	83.00h	89.67e
70.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.00a	75.00g	87.33d
80.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	69.00f	83.67c
90.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	54.33e	73.67b
100.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	40.67d	62.00a
125.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	26.33c	nt
150.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	12.67b	nt
175.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.00a	nt
200.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.00a	nt
LD ₅₀	0.857	0.981	1.714	2.146	3.154	7.236	9.238	56.832	99.00	-
LD ₉₀	2.772	2.85	3.222	6.688	21.373	13.819	18.9	120.205	150.19	-

* Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

Koyu renkli engelleme değerleri test edilen dozda uçucu yağın antifungal etkinliğinin fungusidal özellikte olduğunu gösterir.**nt**: bu dozda test edilmemiştir

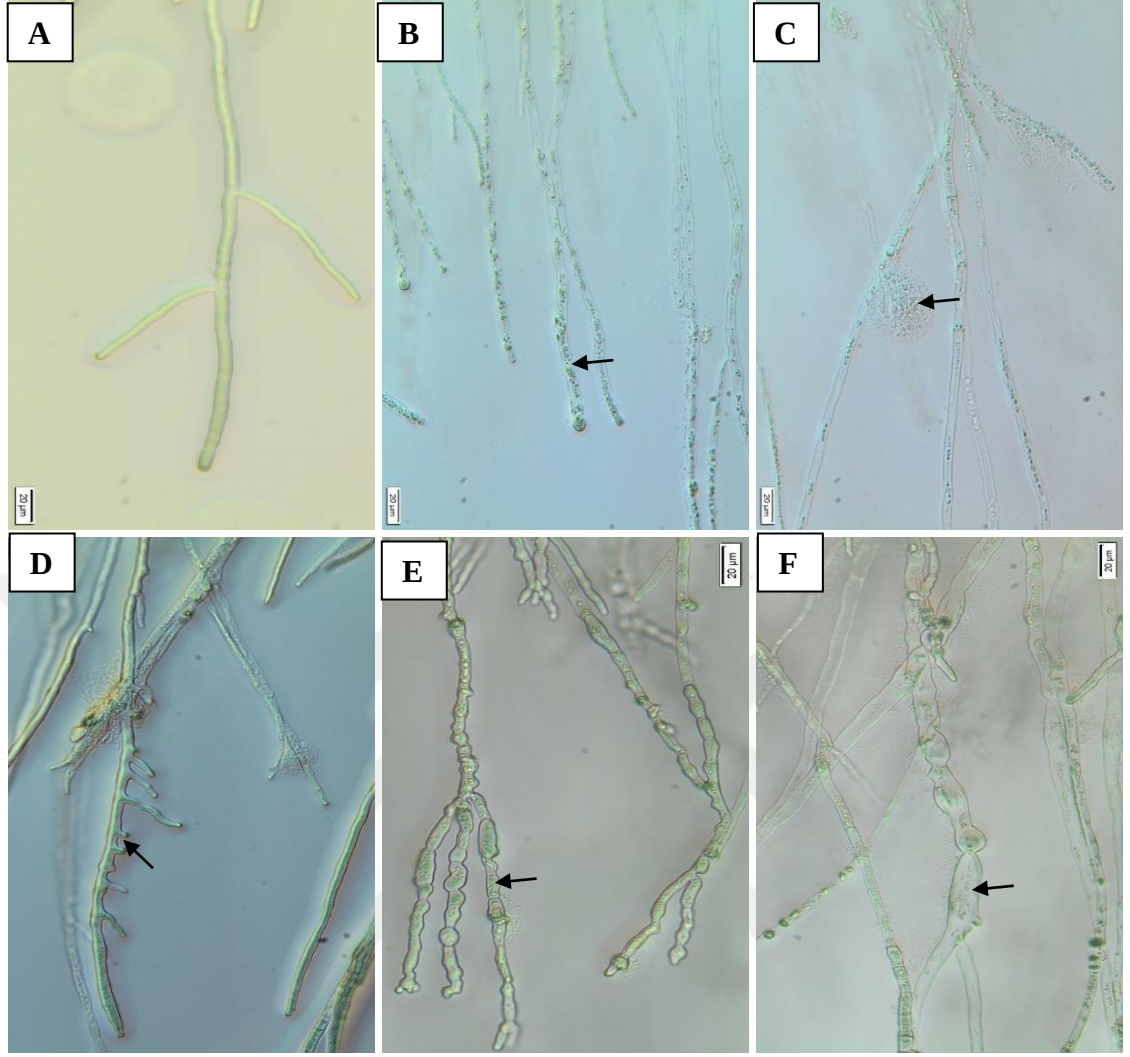
Çizelge 4.3. Farklı dozlarda kullanılan uçucu yağların antaknoz hastalık etmeni *C. karsti*'nin misel gelişiminin %engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği

Bitki Uçucu yağların misel gelişimin %engellenmesi üzerine etkisi										
Dozlar	Tss	Os	Tsy	Fv	Lc	Mentas	Om	Ec	Ca	Fc
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	1.85	11.57	0.00	1.12	4.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.50	42.22	10.82	0.00	7.06	14.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.75	47.04	36.19	3.33	12.27	18.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.00	53.33	48.51	20.74	16.72	24.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.50	64.44	66.42	35.19	28.99	28.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.00	80.37	82.84	53.70	45.35	31.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4.00	100.00	100.00	100.00	64.31	42.96	12.59	8.52	0.00	0.00	0.00
5.00	100.00	100.00	100.00	85.13	52.22	25.56	20.37	0.00	0.00	0.00
6.00	nt	nt	nt	100.00	60.00	39.63	27.78	0.00	0.00	0.00
8.00	nt	nt	nt	100.00	69.63	49.63	33.70	0.00	0.00	0.00
10.00	nt	nt	nt	nt	100.00	65.93	39.63	0.00	0.00	0.00
15.00	nt	nt	nt	nt	100.00	100.00	80.00	0.00	0.00	0.00
20.00	nt	nt	nt	nt	nt	100.00	100.00	0.00	0.00	0.00
25.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	100.00	0.00	0.00	0.00
30.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.00	0.00	0.00
40.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	12.59	0.00	0.00
50.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	23.70	0.00	0.00
60.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	100.00	7.78	0.37
70.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	100.00	16.67	2.96
80.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	23.33	7.04
90.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	39.63	18.15
100.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	54.81	31.11
125.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	70.74	nt
150.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	85.93	nt
175.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	100.00	nt
200.00	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	100.00	nt

4.3. Bitki Uçucu Yağlarının Fungus Misel ve Hif Yapılarında Meydana Getirdiği Morfolojik Değişiklerin Belirlenmesi

Çalışmada nispeten yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösteren kekik (*T. spicata* var. *spicata*), Suriye kekiği (*O. syriacum*), rezene (*F. vulgare*) ve limon otu (*L. citridora*), uçucu yağlarının misel gelişimini tamamen engelledikleri fungisidal MIC dozlarında (4.0, 6.0 ve 10.0 µl/petri) misel yapıları üzerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikler ışık mikroskobu altında incelendiğinde yapılan mikroskobik gözlemlerde seçilen 4 farklı uçucu yağın buhar fazında fungus hifleri üzerinde kontrol petrileredeki sağlıklı hif gelişimleriyle karşılaştırıldığında oldukça şiddetli morfolojik bozulmalara neden olduğu gözlenmiştir. Kontrol petrilereinde oldukça kalın, pürüzsüz hücre duvarına sahip hifler dallanarak boyuna uzamaya devam ederken (Şekil 4.3) 2 gün ön gelişmeye bırakılmış misellerin bulunduğu petrilere *T. spicata*, *O. syriacum*, *F. vulgare* ve *L. citridora* gibi yüksek antifungal etkinlik gösteren uçucu yağının fungisidal MIC dozları (4.0, 6.0 ve 10.0 µl/petri) petrilere ilave edildikten 3 gün sonra yapılan incelemelerde, kontrol petrileredeki fungal hif gelişimleriyle karşılaştırıldığında oldukça şiddetli morfolojik değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir.

Uçucu yağların MIC dozlarına maruz kalmış *C. karstii* hiflerinin kontrol petrileredeki gelişimler (Şekil 4.3) ile karşılaştırıldığında, *O. syriacum* uçucu yağının hiflerin sitoplazmalarındaki koaligasyon ve hücre duvarlarının erimesi sonucu sitoplazmik içeriğin dışarıya doğru çıkmasına neden olduğu, rezene (*F. vulgare*) uçucu yağın daha çok hiflerin kenarlarında ince çıkıntı şeklinde oluşumların (Şekil 4.3C) yanı sıra hiflerin sitoplazmalarında pıhtılaşma (koagülasyon), *T. spicata* uçucu yağının fungisidal MIC dozuna (4.0 µl/petri) maruz kalmış fungus miselleri üzerinde ise *L. citridora* uçucu yağında gözlenen morfolojik değişikliklere benzer şekilde hiflerin septumları arasında kısılma, boğumlaşma, şişme, hiflerin kenarlarında ince çıkıntı şeklinde oluşumların (Şekil 4.3C) yanı sıra hiflerin sitoplazmalarında koaligasyon, hiflerin uç kısımlarında hücre duvarlarının erimesi sonucu sitoplazmik içeriğin dışarıya doğru boşalması şeklinde karakterize edilmiş daha şiddetli morfolojik anormallikler (Şekil 4.3 D) gözlenmiştir.



Şekil 4.3. *O. syriacum* C. karstii'nin kontrol (A), *O. syriacum* (B-C), *F. vulgare* (D) ve *T. spicata* (E-F) uçucu yağların MIC dozlarına maruz kalmış petrilerde gelişen miselleri üzerinde gözlenen morfolojik değişiklikler. Hiflerin sitoplazmalarında kontrol petrilerdeki sağlıklı misellere kıyasla gözlenen koagülasyon (B, C, E), sitoplazmik içeriğin dışarı boşalması (C), hiflerin kenarlarında ince çıkıntı şeklinde oluşumlar (D), boğumlaşma ve genişleme (E-F) şeklinde ortaya çıkan morfolojik anormallikler (ok)

Önceden yapılmış çalışmalarda farklı kekik ve rezene gibi bitkilerden elde edilen uçucu yağlarının buhar fazında fungusidal dozlarında toprak (Bianchi ve ark., 1997; Fiori ve ark., 2000; Nakamura ve ark., 2004; Romagnoli ve ark., 2005; Soylu ve ark., 2007) ve yaprak kökenli (Soylu ve ark., 2006; Soylu ve ark., 2010) bitki patojeni hastalık etmenlerin misel yapılarında benzer morfolojik değişikliklere neden olduğu ışık ve elektron mikroskobu ile yapılan mikroskobik gözlemlerle bildirilmiştir. Bitki uçucu yağları içinde bulunan sekonder bileşikler, özellikle fenolikler, enzimatik aktiviteleri

sonucunda hücre duvarında ve membranında neden olduğu değişikliklerden dolayı misel içerisinde gözlenen morfolojik ve sitoplazmik değişikliklerden sorumlu bileşikler olduğu bildirilmiştir (Knobloch ve ark., 1989; Rasooli ve ark., 2006)

4.4. Antagonist Bakteri İzolatların *C. karstii*'ye Karşı *in vitro* Antagonistik Etkinlikleri, Antagonistik ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi

4.4.1. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının İzolasyonu ve Tanılanması

Antraknoz hastalık etmeni *C. karstii*'nin hastalık oluşturduğu bahçelerde bulunan turunçgil ve avokado ağaçlarının sağlıklı toprak altı (kök, kök boğazı ve köklere yakın topraklardan) ve toprak üstü (kök boğazına yakın gövde, dal, sürgün, yaprak ve meyve) aksamlarından denemelerde kullanılmak üzere aday epifit ve endofit bakteri izolatların izolasyonları önceden bildirilen protokoller uygulanmak suretiyle yapılmıştır (Şekil 3.3). İzolasyonlar sonucunda, bölgeyi, konukçu bitki kısmı ve izole edildiği petriyi temsil edecek şekilde farklı morfolojik görünümlü 32 adeti endofit (%45.7), 37 adeti ise epifit (%52.9) olmak üzere toplam 69 bakteri ve 1 adet maya (%1.4) izolatu olmak üzere 70 aday bakteri ve maya izolatu elde edilmiştir.

Elde edilen tüm izolatlarla biyoetkinlik çalışmalarına geçilmeden önce bitkilerde hastalık etmeni olup olmadığını belirlemek amacıyla sağlıklı tütün yapraklarında HR (Şekil 3.4) ve patates dilimlerinde yumuşak çürüklük testleri (Şekil 3.5) yapılmıştır. Yapılan patojenite testleri sonucunda ve her iki testte negatif sonuç veren 29 adeti endofit, 33 adet, epifit olmak üzere 62 aday bakteri ve 1 maya izolatının, hastalık etmenlerine karşı antagonistik etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla MALDI-TOF MS ile tür tanılanması yapılmıştır.

Elde edilen türler daha sonra tür düzeylerinde belirlenmesi amacıyla 2 tekerrürlü olmak üzere MALDI-TOF yöntemiyle kesin tür teşhisleri yapılmıştır. Yapılan MALDI-TOF analizler sonucunda elde edilen ve indeks değeri 1.7 ve üzerinde olan toplam 58 izolattan 16 tanesi (%27.6) Gram-negatif, 42 tanesi (%72.4) Gram-pozitif olduğu belirlenmiştir. Tür düzeyinde tanısı yapılan 58 izolat arasında yer alan *Bordetella petrii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., ve *Staphylococcus* spp., olarak tanılanan 8 adet

farklı türlere ait izolatların literatürlerde insan patojeni olması nedeni ile denemelerden çıkartılmış ve geri kalan 49 bakteri ve 1 maya izolat ile çalışılmaya karar verilmiştir. Elde edilen 50 izolatın 20 tanesi endofit, 30 tanesi ise epifit karakterli izolatlardır (Çizelge 4.4).

Tür düzeyinde teşhisi yapılan ve denemelerde kullanılan 50 izolata ait sonuçlar Çizelge 4.4 de sunulmuştur. Elde edilen izolatın 12 tanesi dal-gövde, 10 tanesi kök, 13 tanesi meyve, 15 tanesi ise yapraktan izole edilmiştir. İzole edilen izolatların 20 tanesi endofit, 30 tanesi epifit kökenlidir. Bu izolatların konukçu bitkilere göre dağılımlarınıncelendiğinde, 16 izolat avokado ağacından, 34 izolat ise farklı turunçgil ağaçlarından izole edilmiştir.

Elde edilen 31 farklı türe ait bakteri ve 1 maya izolatların cins düzeyinde dağılımı incelendiğinde en yaygın izolatların 32 adet ile *Bacillus* cinsine bağlı olduğu türler olup, bunu sırası ile 2'şer izolatla *Pseudomonas* ve *Lactobacillus*, 1'er izolatla ise *Acinetobacter*, *Chyseobacterium*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Jantinobacterium*, *Klebsiella*, *Lelliottia*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Rhizobacterium*, *Sacharomyces*, *Serratia* ve *Staphylococcus* cinsleri takip etmiştir.

Tür düzeyinde teşhis edilen 49 bakteri izolatın; 12 tanesi Gram-negatif (%24.5), 37 tanesi Gram-pozitif (%75.5) türlerinden oluşmuştur. Gram negatif olarak belirlenen toplam 12 izolat arasında, 2 izolat *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas koreensis*, 1'er izolat ise *Acinetobacter schindleri*, *Chyseobacterium scophthalmum*, *Cronobacter* sp., *Enterobacter cloaceae*, *Jantinobacterium lividum*, *Klebsiella oxytoca*, *Lelliottia amnigena*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobacterium radiobacter* ve *Serratia proteamaculans* olarak tür düzeylerinde tanılanmışlardır. Toplam 37 Gram pozitif izolat arasında, 32 izolat *Bacillus* spp. (%86.5) olarak belirlenirken bunu 2 izolat ile *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, 1'er izolatla *Lysinibacillus sphaericus*, *Paenibacillus polymyxa* ve *Staphylococcus warneri* izolatları izlemişlerdir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Farklı konukçu bitkileri ve bitki kısımlarından izole edilen epifit ve endofit bakteri izolatlar, genel özellikleri ve MALDI-TOF tanı sonuçları

İzolat Adı	Konukçu Bitkisi	Bitki Kısım	Gram Reaksiyon	MALDI Skoru
<i>Acinetobacter schindleri</i> KGA32en	Avokado	Meyve	-	2.20
<i>Bacillus atrophaeus</i> KGT7en	Limon	Gövde	+	2.10
<i>Bacillus cereus</i> KGT13en	Limon	Gövde	+	2.36
<i>Bacillus cereus</i> KGT16en	Portakal	Meyve	+	2.31
<i>Bacillus megaterium</i> KGT11ep	Portakal	Dal	+	2.41
<i>Bacillus mojavensis</i> KGT1ep	Portakal	Dal	+	2.05
<i>Bacillus mojavensis</i> KGT5ep	Limon	Dal	+	2.07
<i>Bacillus mycoides</i> KGT8en	Greyfruit	Kök	+	2.35
<i>Bacillus pseudomycoide</i> sKGT22ep	Mandarin	Kök	+	1.99
<i>Bacillus pumilus</i> KGT4en	Mandarin	Kök	+	1.96
<i>Bacillus pumilus</i> KGT6ep	Turunç	Meyve	+	2.36
<i>Bacillus simplex</i> KGT9ep	Limon	Kök	+	1.97
<i>Bacillus subtilis</i> KGT2ep	Mandarin	Dal	+	2.00
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KGA27ep	Avokado	Dal	+	2.27
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KGT12ep	Portakal	Kök	+	1.98
<i>Bacillus amyloliquefaciens_ssp_plantarum</i> KGA33ep	Avokado	Meyve	+	2.01
<i>Bacillus atrophaeus</i> KGA29ep	Avokado	Yaprak	+	2.13
<i>Bacillus atrophaeus</i> KGA40en	Avokado	Meyve	+	2.02
<i>Bacillus cereus</i> KGA25ep	Avokado	Gövde	+	2.35
<i>Bacillus cereus</i> KGA26ep	Avokado	Dal	+	2.47
<i>Bacillus cereus</i> KGA44en	Avokado	Dal	+	2.25
<i>Bacillus cereus</i> KGT18ep	Limon	Dal	+	2.33
<i>Bacillus cereus</i> KGT19ep	Portakal	Meyve	+	2.42
<i>Bacillus cereus</i> KGT24ep	Portakal	Yaprak	+	2.17
<i>Bacillus cereus</i> KGT49ep	Limon	Yaprak	+	2.06
<i>Bacillus megaterium</i> KGT21en	Portakal	Gövde	+	2.29
<i>Bacillus megaterium</i> KGT39ep	Limon	Kök	+	2.39
<i>Bacillus mojavensis</i> KGT17en	Mandarin	Gövde	+	2.01
<i>Bacillus mojavensis</i> KGT20ep	Turunç	Yaprak	+	1.97
<i>Bacillus pumilus</i> KGA37ep	Avokado	Dal	+	2.06
<i>Bacillus simplex</i> KGA31en	Avokado	Dal	+	2.04
<i>Bacillus simplex</i> KGT23en	Portakal	Meyve	+	2.19
<i>Bacillus thurigiensis</i> KGT15ep	Limon	Gövde	+	2.39
<i>Chyseeobacterium scopthalmum</i> KGA46en	Avokado	Meyve	-	1.95

Çizelge 4.4. (Devam) Farklı konukçu bitkileri ve bitki kısımlarından izole edilen epifit ve endofit bakteri izolatlar, genel özellikleri ve MALDI-TOF tanı sonuçları

İzolat Adı	Konukçu Bitkisi	Bitki Kısım	Gram Reaksiyon	MALDI Skoru
<i>Cronobacter</i> sp. KGT51ep	Limon	Kök	-	2.13
<i>Enterobacter cloacae</i> KGA50en	Avokado	Meyve	-	2.34
<i>Jantionobacterium lividum</i> KGA48en	Avokado	Kök	-	2.29
<i>Klebsiella oxytoca</i> KGA30ep	Avokado	Kök	-	2.36
<i>Lactobacillus brevis</i> KGT41ep	Limon	Dal	+	2.47
<i>Lactobacillus plantarum</i> KGT42ep	Mandarin	Meyve	+	2.46
<i>Lelliottia amnigena</i> KGA38en	Avokado	Kök	-	2.42
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> KGT3en	Limon	Dal	+	2.40
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KGT45ep	Mandarin	Yaprak	+	2.04
<i>Pantoea agglomerans</i> KGT35En	Greyfruit	Dal	-	2.15
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> KGT10ep	Mandarin	Yaprak	-	2.35
<i>Pseudomonas koreensis</i> KGT47en	Portakal	Kök	-	1.98
<i>Rhizobacterium radiobacter</i> KGT52ep	Portakal	Kök	-	2.21
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> KGT43ep	Mandarin	Meyve	Y	2.23
<i>Serratia proteamaculans</i> KGT34en	Mandarin	Kök	-	2.34
<i>Staphylococcus warneri</i> KGA28ep	Avokado	Kök	+	1.98

(+): Gram pozitif bakteri; (-): Gram negatif bakteri; (Y): maya

Söz konusu 49 bakteri izolat arasında 5 *Bacillus* türün (*Bacillus cereus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus megaterium* *Bacillus pumilis* ve *Bacillus simplex*) hem epifit hemde endofit izolatları elde edilmiştir.

Bitkilerin kök ve toprak bölgesi (rizosfer) ile toprak üstü aksamaları (phylosphere) gerek epifit gerekse endofit olarak yaşayan farklı türlere ait pek çok yararlı fungal, bakteriyel, viral mikrobiomlara konukçuluk eder. Bu tür bölgelerden farklı α , β ve γ Proteobacteria şubesinin yanı sıra Firmicutes ve Actinobakteri türlerine ait epifit ve endofit bakteri izolatları elde edilmiş olup, yapılan tanılama çalışmalarında endofit bakteri izolatlarının aynı zamanda bitkilerin farklı kısımlarında epifit olarakta karşılaşılabileceği bildirilmiştir (Hallmann ve ark., 1997; Sturz ve ark., 2000; Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2006; Sun ve ark., 2009; Romero ve ark., 2014; Shi ve ark., 2014; Santayo ve ark., 2016). Marquez-Santacruz ve ark. (2010) bitkilerin içsel dokularından izole edilen endofit bakteri izolatların tohum, çelik, aşı gözü gibi bitkisel

üretim materyalleri içerisinde gelişebilen toprakta yaşayan rizosfer kökenli bakterilerin alt populasyon grubu olabileceğini bildirmiştir.

4.4.2. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının *C. karstii*'nin Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine Antagonistlik Etkinliklerinin *in vitro* Koşullarda Belirlenmesi

Tütün yapraklarında ve patates dilimleri üzerinde yapılan patojenisite testlerinde (HR ve patates çürüklük testleri) negatif sonuç veren 50 endofit ve epifit bakteri ve maya izolatın *C. karstii*'nin misel gelişimini engelleme (antagonistik) etkinlikleri 1:1 oranında karıştırılarak kullanılan PDA ve TSA besiyeri içeren petri kaplarında ikili kültür testlemeleriyle (Şekil 3.6) belirlenmiştir.

Bakteri izolatlarının test edildiği fungal etmenlerinin misel gelişimlerini engelleme oranları; **(i) hiç engelleyemeyenler, (ii) %0.5-24.9 zayıf düzeyinde engelleyenler, (iii) %25.0-49.9 orta düzeyinde engelleyenler ve (iv) %50.0>güçlü düzeyde engelleyen** izolatlar olmak üzere 4 grup altında incelenmiştir (Dalal ve Kulkarni, 2014). *In vitro* ikili kültür test sonuçlarına göre kullanılan tüm izolatların test edildikleri hastalık etmenin misel gelişimlerini zayıftan güçlüye olmak üzere değişen oranlarda engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

İkili kültür testlemelerinde test edilen 50 endofit ve epifit bakteri ve maya izolatının fungal hastalık etmeni *C. karstii*'nin misel gelişimini engelleme düzeyleri değerlendirildiğinde; 3 izolatın (%6.0) misel gelişimini %0.1-24.9 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 14 izolatın (%28.0) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyinde** engellediği, 33 izolatın (%66.0) ise misel gelişimini >%50 bir oranda olmak üzere **güçlü düzeyde** engellediği gözlenmiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.5. Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Colletotrichum karstii*'nin misel gelişimini engelleme potansiyelleri. Bakteri izolatları etkinliklerine göre sıralanmıştır

<i>İzolat</i>	Antagonistik Etki^a	
	MG	MGE
<i>Bacillus mojavensis</i> KGT1ep	10.33 ^a	82.78
<i>Bacillus subtilis</i> KGT2ep	15.00 ^b	75.00
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KGT12ep	16.33 ^{bc}	72.78
<i>Bacillus atrophaeus</i> KGT7en	16.67 ^{bc}	72.22
<i>Bacillus cereus</i> KGT13en	16.67 ^{bc}	72.22
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> KGT10ep	16.67 ^{bc}	72.22
<i>Bacillus atrophaeus</i> KGA29ep	17.67 ^{b-d}	70.56
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KGA27ep	18.33 ^{cd}	69.44
<i>Bacillus pseudomyoides</i> KGT22ep	18.67 ^{c-e}	68.89
<i>Bacillus cereus</i> KGA26ep	19.33 ^{c-f}	67.78
<i>Bacillus pumilus</i> KGT6ep	20.33 ^{d-g}	66.11
<i>Bacillus amyloliquefaciens_ssp_plantarum</i> KGA33ep	20.33 ^{d-g}	66.11
<i>Bacillus atrophaeus</i> KGA40en	21.33 ^{e-h}	64.44
<i>Bacillus cereus</i> KGT49ep	21.67 ^{f-i}	63.89
<i>Bacillus mycoides</i> KGT8en	22.33 ^{f-j}	62.78
<i>Klebsiella oxytoca</i> KGA30ep	22.33 ^{f-j}	62.78
<i>Bacillus simplex</i> KGT9ep	23.00 ^{g-j}	61.67
<i>Bacillus pumilus</i> KGA37ep	24.00 ^{h-k}	60.00
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KGT45ep	24.00 ^{h-k}	60.00
<i>Pseudomonas koreensis</i> KGT47en	24.00 ^{h-k}	60.00
<i>Bacillus mojavensis</i> KGT20ep	24.33 ^{h-k}	59.44
<i>Bacillus mojavensis</i> KGT5ep	24.67 ^{i-l}	58.89
<i>Bacillus cereus</i> KGT18ep	25.00 ^{j-m}	58.33
<i>Bacillus mojavensis</i> KGT17en	26.33 ^{k-n}	56.11
<i>Bacillus cereus</i> KGT16en	27.33 ^{l-o}	54.44
<i>Chyseeobacterium scopthalmum</i> KGA46en	27.33 ^{l-o}	54.44
<i>Bacillus cereus</i> KGT24ep	27.67 ^{m-o}	53.89
<i>Bacillus thuringiensis</i> KGT15ep	28.00 ^{no}	53.33
<i>Pantoea agglomerans</i> KGT35en	28.33 ^{n-p}	52.78
<i>Staphylococcus warneri</i> KGA28ep	28.33 ^{n-p}	52.78
<i>Bacillus pumilus</i> KGT4en	29.00 ^{n-r}	51.67
<i>Bacillus cereus</i> KGT19ep	29.67 ^{o-s}	50.56
<i>Serratia proteamaculans</i> KGT34en	29.67 ^{o-s}	50.56
<i>Bacillus cereus</i> KGA25ep	30.33 ^{o-s}	49.44
<i>Bacillus cereus</i> KGA44en	31.00 ^{p-t}	48.32
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> KGT3en	31.33 ^{p-t}	47.78
<i>Jantionobacterium lividum</i> KGA48en	31.67 ^{r-t}	47.22
<i>Lelliottia amnigena</i> KGA38en	31.67 ^{r-t}	47.22

Çizelge 4.5. (Devam) Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Colletotrichum karstii*'nin misel gelişimini engelleme potansiyelleri. Bakteri izolatları etkinliklerine göre sıralanmıştır

<i>İzolat</i>	Antagonistik Etki^a	
	MG	MGE
<i>Bacillus simplex</i> KGA31en	32.33 ^{s-u}	46.11
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> KGT43ep	34.00 ^{t-v}	43.33
<i>Lactobacillus plantarum</i> KGT42ep	34.67 ^{uv}	42.22
<i>Bacillus megaterium</i> KGT11ep	36.00 ^v	40.00
<i>Bacillus megaterium</i> KGT21en	36.67 ^v	38.89
<i>Bacillus simplex</i> KGT23en	36.67 ^v	38.89
<i>Bacillus megaterium</i> KGT39ep	37.00 ^v	38.33
<i>Lactobacillus brevis</i> KGT41ep	37.00 ^v	38.33
<i>Enterobacter cloaceae</i> KGA50en	39.47 ^v	34.22
<i>Acinetobacter schindleri</i> KGA32en	49.67 ^{yz}	17.22
<i>Rhizobacterium radiobacter</i> KGT52ep	51.1 ^{yz}	8.04
<i>Cronobacter sp.</i> KGT51ep	59.8 ^z	0.33
Kontrol (<i>C. karstii</i>)	60.00 ^z	0.00

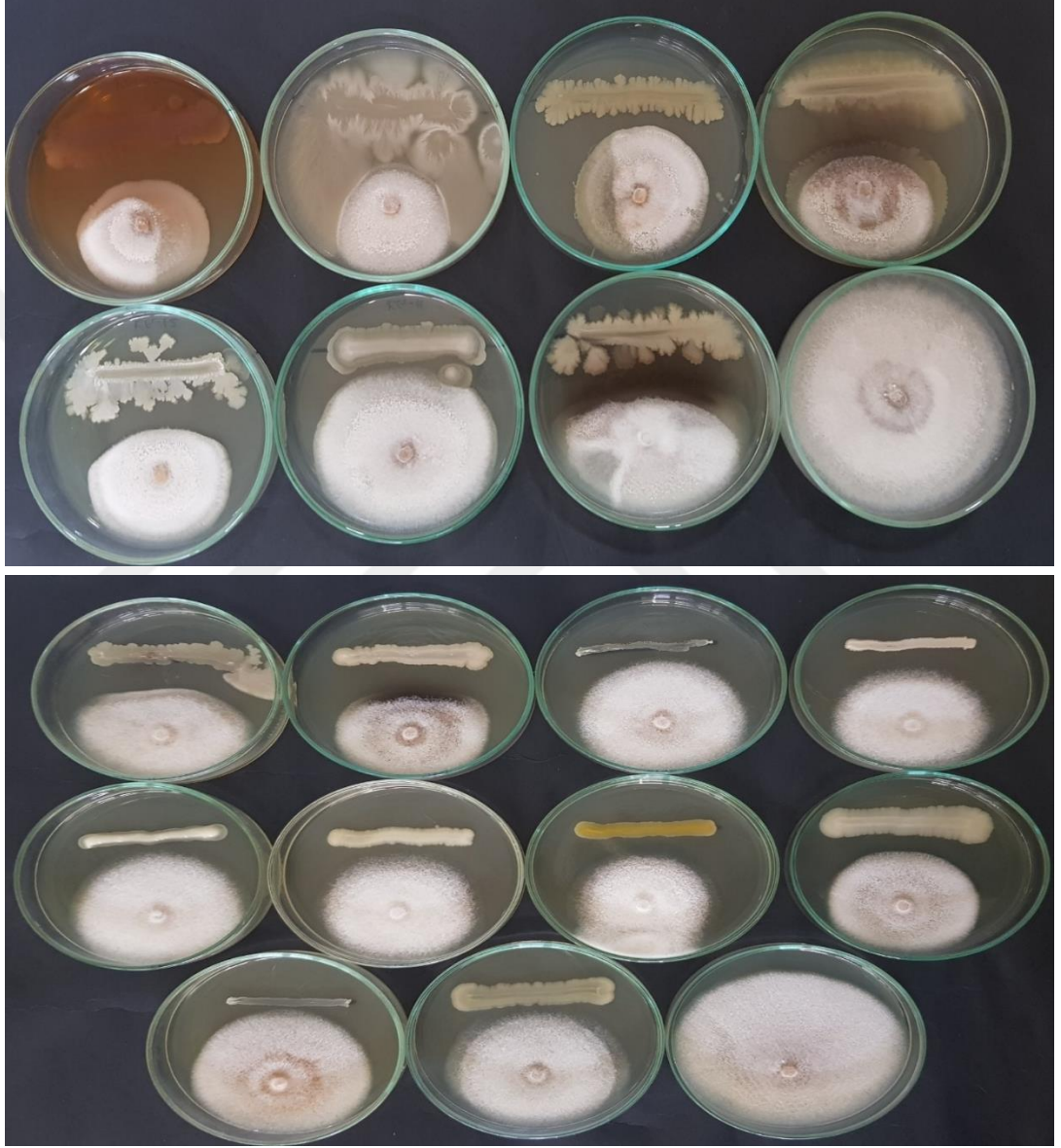
MG: Misel Gelişimi; **MGE:** Misel Gelişiminin Engellenme oranı (%)

^a Sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı küçük harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)

Yapılan istatistik analiz sonucunda izolatlar arasında önemli farklılıkların olduğu, yüksek etkinlik gösteren izolatlar arasında *Pseudomonas chlororaphis* dışında genelde Gram pozitif bakteri türlerinin (özellikle *Bacillus* spp. bağlı izolatlar) hastalık etmeninin misel gelişimini etkili bir şekilde engellediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Hastalık etmeninin misel gelişimini en güçlü engelleyen izolat %82.78 engelleme oranı ile *Bacillus mojavensis* KGT1epizolatı olurken bu izolatı sırasıyla %75.0 engelleme oranı ile *Bacillus subtilis* KGT2epve%72.78 engelleme oranı ile *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12epizolatları izlemiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.5). Misel gelişimini engellemede en etkili ilk 10 izolatın 2 tanesi endofit, 8 tanesi epifit karekterde izolat olduğu gözlenmiştir. Test edilen antagonist bakteri izolatları arasında aynı türe ait izolatların fungal etmene karşı gösterilen antagonist etkinliklikler arasında istatistiksel olarak önemli düzeylerde farklılıklar görülmüştür (Şekil 4.4).

Hastalık etmenine karşı en düşük antagonistik etkinlik%0.33-17.22 engelleme oranları ile *Cronobacter sp.* KGT51ep, *Rhizobacterium radiobacter* KGT52ep ve *Acinetobacter schindleri*KGA32en izolatları tarafından gösterilmiştir. Yapılan istatistik analizlerde izolatların kontrol grubu ile aynı istatistik grubunda yer aldığı belirlenmiştir.

Epifit ve endofit bakteri izolatlarının misel gelişimini engelleme etkinliklerine göre değerlendirildiğinde, epifit bakterilerin antagonist etkinliği %0.33-82.78 aralığında (ortalama %55.88), endofit bakteri izolatlarının ise antagonist etkinliği %17.22-72.22 aralığında değiştiği (ortalama 50.88) tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. İkili kültür testlemeleri ile farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen *C. karstii*'nin misel gelişimini değişen oranlarda engelleme potansiyelleri

Çalışmalarımızda kullanılan *C. karstii* üzerine yapılmış herhangi bir biyolojik mücadele çalışmasına rastlanılmamıştır. *C. karstii*'nin misel gelişimini >%50 üzerinde

engellemek suretiyle antagonistik etkinlik gösteren toplam 33 izolattan 25 tanesinin (%75.8) *Bacillus* spp. ait olduğu tespit edilmiştir.

Bacillus ve *Pseudomonas* cinslerine dahil bir çok biyokontrol izolatlar ve bunların biyoaktif sekonder metabolitleri, doğrudan antibiyoz (antagonistiki etkinlik), bitki büyümesinin teşviki ve konukçu bitkilerinde sistemik direncin teşvik edilmesi gibi çeşitli mekanizmaları kullanmak suretiyle bitki sağlığı açısından faydalı bakteriyel mikrobiyomlar olarak kabul edilebilir (Dimkic ve ark., 2022). *Bacillus* ve *Pseudomonas* spp. ait izolatların farklı konukçu bitkilerde hastalıklara neden olan birçok tohum, toprak, yaprak ve depo kökenli fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeylerde antagonistik etkinlikler gösterdikleri bildirilmiştir (Soylu ve ark., 2005; Soylu ve ark., 2021; Soylu ve ark., 2022). Doğrudan antibiyoz, konukçu bitkide uyarılmış bir bağışıklık sistemi tepkisi (ISR) ve besinler ve yer için rekabet bu cinslerin kullandıkları en yaygın biyokontrol etki mekanizmalarıdır. Antagonist bakteri izolatları tarafından sergilenen biyoetkinliklerden genelde aralarında çalışmalarımızda da belirlediğimiz antimikrobiyal bileşiklerin (siderofor, proteaz, amonyak gibi) yanı sıra biysürefektant, phenazine-1-carboxylic acid, 2-hydroxy-phenazine, cyclic lipopeptide ve laharenoic acid A gibi peptidler, mikolitik enzimlerden chitinaz, β -1,3-glucanase and β -1,4-glucanase gibi enzimlerin rol oynadığı bildirilmiştir (Huang and Chen, 2004; Araujo ve ark. 2005; Chung ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008; Chaiharu ve ark., 2008; Gupta ve ark., 2006; Xiao ve ark., 2009; Senthilkumar ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2010; Bacon ve ark., 2012; Kumar ve ark., 2012; Shadid ve ark., 2017).

Bacillus cinsine ait türler, hızlı büyümeleri, kullanım kolaylığı ve mükemmel kolonizasyon özellikleri nedeniyle genellikle biyolojik mücadele çalışmalarıyla biyolojik preparat yapımında en ideal türler olarak kabul edilir. Olumsuz çevre koşullarına karşı korumayı sağlayan endospor oluşturan *Bacillus* izolatları, besin gereksinimleri için birçok bitki patojenleri ile dolaylı olarak rekabet ederek ya da doğrudan aktif olan iturin, surfaktin ve fengisin gibi çeşitli lipopeptit bileşikleri üreterek gelişimlerini baskılayabilir ve tamamen engelleyebilir. Ayrıca *Bacillus* spp. tarafından üretilen alkoller, aldehitler, aromatikler, sülfürler ve ketonlar dahil olmak üzere uçucu maddeler bitkilerde sistemik direnci teşvik edebilir. *Bacillus* spp. kaynaklı lipopeptidler, poliketidler, uçucu bileşikler aynı zamanda Jasmonik asit (JA), salisilik asit (SA) veya etilen (ET) sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla, konukçu bitkilerde patojenez ile ilgili

(PR) proteinleri ve diğer savunma ile ilgili proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu uyarabilir. *Bacillus* izolatları ve bunların uçucu bileşenlerinin başka bir özelliği ise fungal hastalık etmenlerinin misel büyümesi, penetrasyon, sporulasyon ve virülenslikte yer alan genlerin ekspresyonunu aşağı doğru regüle etme yeteneği olarak bildirilmiştir(Dimkic ve ark., 2022).

Bacillus spp ait izolatların bitki gelişimini teşvik etmelerinin yanısıra, üretmiş oldukları antimikrobiyal etkiye sahip 70'den fazla bileşiklerinfarklı ürünlerde sorun olan tohum, toprak, yaprak ve depo kökenli fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı etkinlik gösterdiğibildirilmiştir. *Bacillus* spp. arasında özellikle *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. pseudomycoides*, *B. cereus*, *B. tequilensis*, *B. mycoides*ve *B. simplex* gibi türler biyolojik mücadele çalışmalarında öne çıkan türler olarak bildirilmiştir (Stein, 2005; Guerrero-Barajas ve ark., 2020). *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus* ve *B. thuringiensis* tarafından sentezlenen iturin, surfactin, lichenysin, fengycin gibi bileşenlerin farklı fungal ve bakteriyel hastalıklara karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda antimikrobiyal etkiye sahip bileşenler olduğu belirlenmiştir (Tsuge ve ark., 1999; Kim ve ark., 2004; Huszcza ve Burczyk, 2006).

Agrobacterium, *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinslerine bağlı bakteri izolatlardan üretilen biyolojik kökenli preparatlar dünyapestisitpazarında oldukça önemli bir yere sahiptir (Fravel, 2005). Bu cinsler arasında *Bacillus* spp. (özellikle *Bacillus subtilis*) ait endofit ve epifit bakteri izolatları farklı moleküler yapıya sahip antimikrobiyal bileşikler üretmeleri, üretilen bileşiklere karşı hastalık etmenlerin dayanıklılık geliştirememesi, bu türe ait izolatların olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklı endospor oluşturmaları gibi özelliklerinden dolayı biyofungusit pazarında ve biyolojik mücadele çalışmalarında en fazla araştırılmaları yapılan biyokontrol etmenleridir. Biyolojik mücadele preparatı pazarının%50'den fazlasını *Bacillus* spp.ait biyopreparatlar oluşturur. Lepidoptera larvalarına karşı insektisid olarak kullanılan *B. thuringiensis* preparatları pazarda en yüksek paya (>%70) sahip biyoprepat olarak bilinir. Son yıllarda bilinçli tüketicilerin artmasıyla organik tarıma olan pozitif yaklaşımlar, farklı *Bacillus* spp.ait (*Bacillus subtilis* strain GBO3, *B. subtilis* strain QST 713, *B. subtilis* MBI 600, *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* strain FZB24, *B. licheniformis* strain SB3086 ve *B. pumilus* GB 34) izolatlardan üretilen biyopreparatlar fungal ve bakteriyel hastalıklara karşı birçok ülkede

yaygın olarak ruhsatlı olarak kullanılmak suretiyle pazardaki yerleri ciddi şekilde artış göstermektedir.

Bacillus gibi bir diğer önemli biyolojik mücadele etmeni türleri içeren *Pseudomonas*, karmaşık bitki-patojen-antagonist etkileşimine aktif olarak katılan, bitki sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunan, biyokontrol potansiyeli olan türler açısından zengin kozmopolit bir bakteri cinsidir. *Pseudomonas* spp. tarafından üretilen en yaygın moleküller 2,4-diacetylphloroglucinol, phenazine-1-carboxylic acid, phenazine-1-carboxamide, pyoluteorin ve pyrrolnitrin sayılabilir. *Pseudomonas* spp. tarafından üretilen bu bileşiklerin yanı sıra nunamycin, nunapeptin, brasmycin ve braspeptin gibi cyclic lipopeptidler tarımda bitki biyokontrolü ve biyostimülasyon ajanları olarak yoğun bir şekilde çalışılmıştır (Dimkic ve ark., 2022). Nunamycin, nunapeptin, brasmycin ve braspeptin gibi bileşikler fungal hastalık etmenlerin büyüme ve gelişiminin önlenmesinde temel rol oynayan bileşikler olarak tanımlanmışlardır (Bernal ve ark., 2002; Jiang ve ark., 2015). Bu bileşiklerin yanısıra phenazines, sessilins ve orfamides bazı fungal hastalıklarının baskılanmasında ilave rollere sahip olduğu gösterilmiştir. Gerek *Bacillus* gerekse *Pseudomonas* spp. ait izolatlar chitinases, glucanases ve proteases'lar gibi birçok fungal bitki hastalığının baskılanmasında rol oynayan enzimleri üretirler. Üretilen bu enzimler esas olarak fungal patojen biyokütlesinin ve hücre duvarlarının yıkılmasını sağlar (Dimkic ve ark., 2022).

Farklı konukçu bitkilerde sorun *Colletotrichum* spp. karşı diğer ülkelerde yapılan mücadele çalışmaları bulunmakla birlikte (Stirling ve ark., 2015; Guardado-Valdivia ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2019), yapılan kapsamlı literatür araştırmasında antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum karstii*'ye karşı gerek ülkemizde gerekse diğer ülkelerde yapılmış herhangi bir biyolojik mücadele çalışmalarına rastlanılmıştır. Bu kapsamdan çalışmamız gerek ülkemiz gerekse dünya genelinde *C. karstii*'nin biyolojik mücadelesine yönelik yapılmış ilk çalışmadır.

Turunçgillerde farklı *Colletotrichum* spp.'ye karşı daha önceden yapılmış olan oldukça sınırlı sayıda çalışmaya rastlanılmıştır. Yapılan biyolojik mücadele çalışmalarında bir maya türü olan *Pichia membranaefaciens* ile *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus tequilensis* izolatlarının turunçgil, papaya, asma çilek ve avokado bitkilerinde sorun olan *Colletotrichum gloeosporioides* hastalık etmenine karşı biyolojik mücadele kapsamında

etkinliklerini gerek *in vitro* gerekse *in vivo* koşullarda ortaya koymuşlardır (Kupper ve ark., 2010; Osman ve ark., 2011; Mochizuki ve ark., 2012; Zhou ve ark., 2016; Guerrero-Barajas ve ark., 2020). Söz konusu yapılan çalışmalarda biyokontrol etmeni izolatların fungal etmenin iturin A, ituD ve lpa-14 isimli antimikrobiyal bileşeninin sentezlenmesinde rol oynayan genleri aktive ettiği, proteaz, indol asetik asitve siderofor gibi etki mekanizmaları kullanmak suretiyle spor çimlenmesini ve misel gelişimini engellediği, misel yapısında morfolojik bozulmalara neden olduğu, *in vivo* koşullarda uygulama yapılan konukçu bitkilerde hastalık çıkışının ciddi düzeylerde baskılandığı bildirilmiştir.

4.4.3. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişiminin Engellenmesinden (Antagonistik) Sorumlu Olası Biyokontrol Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi

Denemlerde antagonistik etkinlikleri araştırılan izolatların fungal etmenin misel gelişiminin engellenmesinden (antagonistik) sorumlu olabilecek olası biyokontrol etki mekanizmalarından siderofor, proteaz enzimi, hidrojen siyanür (HCN) ve amonyak (NH₃) üretme kapasiteleri bu mekanizmaların karakterizasyonuna spesifik besi yerleri üzerinde oluşturdıkları engelleme zonlarının bakteri çapına kıyaslanmasıyla hesaplanmış indeks değerleri ile kantitatif (Şekil 3.10A,B), geliştikleri besi yerlerinde sebep oldukları renk değişiklik şiddetlerine göre ise kalitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.10D,E). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6’da toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *C. karstii*’nin misel gelişimini engellemede kullandıkları olası biyokontrol mekanizmaları^a

	<i>Bakteri İzolatı</i>	<i>Sid-İnd</i>	<i>Pro-İnd</i>	<i>NH₃</i>	<i>HCN</i>
1	<i>Enterobacter cloaceae</i> KGA50en	3.00 ^o	0.00 ^a	+	-
2	<i>Chyseeobacterium scopthalmum</i> KGA46en	2.89 ^o	0.00 ^a	nt	nt
3	<i>Serratia proteamaculans</i> KGT34en	2.63 ⁿ	2.09 ^m	++	++
4	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> KGT10ep	2.10 ^m	1.44 ^h	+++	+++
5	<i>Klebsiella oxytoca</i> KGA30ep	2.09 ^m	0.00 ^a	++	++
6	<i>Bacillus mojavensis</i> KGT1ep	1.95 ^m	1.16 ^{b-d}	+++	-
7	<i>Pseudomonas koreensis</i> KGT47en	1.76 ^l	1.10 ^{bc}	nt	nt
8	<i>Lelliottia amnigena</i> KGA38en	1.62 ^{kl}	0.00 ^a	+	-
9	<i>Bacillus amyloliquefaciens_ssp_plantarum</i> KGA33ep	1.59 ^{kl}	1.23 ^{d-f}	±	-
10	<i>Jantionobacterium lividum</i> KGA48en	1.53 ^{jk}	0.00 ^a	±	-

Çizelge 4.6. (Devam) Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *C. karstii*'nin misel gelişimini engellemede kullandıkları olası biyokontrol mekanizmaları^a

<i>Bakteri İzolatu</i>	Sid-İnd	Pro-İnd	NH₃	HCN
11 <i>Pantoea agglomerans</i> KGT35En	1.48 ^{i-k}	0.00 ^a	+	-
12 <i>Bacillus thurigiensis</i> KGT15ep	1.44 ^{b-k}	1.56 ⁱ	++	-
13 <i>Lactobacillus plantarum</i> KGT42ep	1.39 ^{g-j}	0.00 ^a	++	-
14 <i>Staphylococcus warneri</i> KGA28ep	1.38 ^{f-j}	0.00 ^a	±	-
15 <i>Bacillus cereus</i> KGT13en	1.36 ^{e-j}	1.29 ^{e-g}	++	±
16 <i>Bacillus pseudomyoides</i> KGT22ep	1.32 ^{d-i}	0.00 ^a	++	+
17 <i>Lactobacillus brevis</i> KGT41ep	1.30 ^{c-i}	nt	++	-
18 <i>Cronobacter</i> sp. KGT51ep	1.28 ^{b-h}	0.00 ^a	nt	nt
19 <i>Bacillus pumilus</i> KGA37ep	1.23 ^{a-g}	1.22 ^{d-f}	++	-
20 <i>Paenibacillus polymyxa</i> KGT45ep	1.22 ^{a-g}	1.67 ^{jk}	±	-
21 <i>Lysinibacillus sphaericus</i> KGT3en	1.18 ^{a-f}	0.00 ^a	±	-
22 <i>Bacillus simplex</i> KGA31en	1.18 ^{a-f}	0.00 ^a	±	-
23 <i>Bacillus megaterium</i> KGT11ep	1.17 ^{a-e}	1.18 ^{c-e}	nt	nt
24 <i>Bacillus pumilus</i> KGT4en	1.16 ^{a-e}	1.05 ^b	-	-
25 <i>Bacillus megaterium</i> KGT21	1.15 ^{a-d}	1.95 ^l	±	-
26 <i>Sacharomyces cerevisiae</i> KGT43ep	1.13 ^{a-d}	0.00 ^a	+	-
27 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KGT12ep	1.11 ^{a-c}	1.23 ^{d-f}	++	-
28 <i>Bacillus atrophaeus</i> KGA40en	1.11 ^{a-c}	1.33 ^{fg}	++	-
29 <i>Rhizobacterium radiobacter</i> KGT52ep	1.11 ^{a-c}	0.00 ^a	nt	nt
30 <i>Bacillus pumilus</i> KGT6ep	1.11 ^{ab}	0.00 ^a	nt	nt
31 <i>Bacillus megaterium</i> KGT39ep	1.10 ^{a-c}	1.74 ^k	+	+
32 <i>Acinetobacter schindleri</i> KGA32en	1.10 ^{a-c}	0.00 ^a	±	-
33 <i>Bacillus atrophaeus</i> KGT7en	1.08 ^{ab}	1.15 ^{b-d}	+++	-
34 <i>Bacillus mojavensis</i> KGT17en	1.08 ^{ab}	1.33 ^{fg}	nt	nt
35 <i>Bacillus cereus</i> KGA26ep	1.06 ^a	1.45 ^h	nt	nt
36 <i>Bacillus subtilis</i> KGT2ep	1.05 ^a	1.09 ^{bc}	+++	-
37 <i>Bacillus cereus</i> KGT16en	1.04 ^a	1.76 ^k	nt	nt
38 <i>Bacillus mojavensis</i> KGT5ep	1.03 ^a	1.19 ^e	±	-
39 <i>Bacillus atrophaeus</i> KGA29ep	nt	0.00 ^a	nt	nt
40 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KGA27ep	nt	1.70 ^{jk}	nt	nt
41 <i>Bacillus mycoides</i> KGT8en	nt	1.63 ^{ij}	nt	nt
42 <i>Bacillus cereus</i> KGT18ep	nt	1.39 ^{gh}	nt	nt
43 <i>Bacillus cereus</i> KGA44en	nt	nt	+	-
44 <i>Bacillus simplex</i> KGT23	nt	1.76 ^k	nt	nt

Sid-İnd: Siderofor; **Pro-İnd:** Proteaz; **NH₃:** Amonyak; **HCN:** Hidrojen Siyanür; **nt:** denemede kullanılmamıştır-, renk değişimi olmadığını, ±, +, ++, +++ ise HCN veya amonyak konsantrasyonunun artışına paralel renk değişim şiddetindeki artışını gösterir.

^a Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı küçük harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)

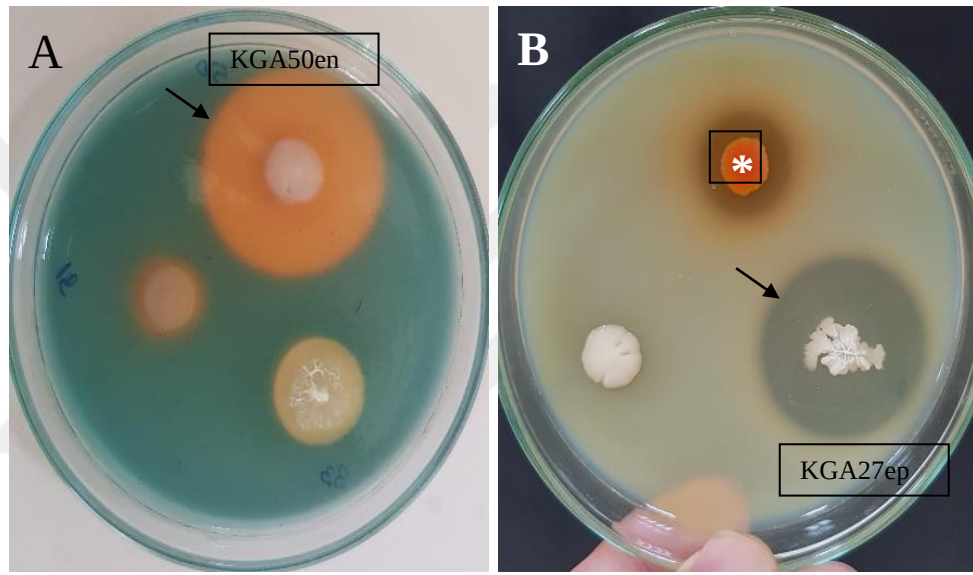
Çizelge 4.6'da görüleceği gibi seçilmiş 38 bakteri izolatın CAS besi yeri üzerinde oluşturulan siderofor zonunun bakteri çapına oranlanmasıyla elde edilen en siderofor indeks değerleri incelendiğinde, en yüksek siderofor üretme etkinliği 3.0 ile *Enterobacter cloaceae* KGA50en izolatı tarafından oluşturulmuş olup (Şekil 4.5A), bu

izolatı 2,89-2.09 arasında değişen indeks değerlerle *Chysoebacterium scopthalmum* KGA46en, *Serratia proteamaculans* KGT34en, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10epve *Klebsiella oxytoca* KGA30ep izolatları izlemiştir (Çizelge 4.6). Test edilen tüm izolatların 1.03-3.0 siderofor indeks değeri ile siderofor oluşturma yeteneğinde oldukları, farklı türlerin veya aynı türe bağlı izolatlar siderofor oluşturma açısından istatistiksel olarak birbirlerinden önemli düzeyde farklılık gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Test edildikleri fungal etmenin misel gelişimini >%70 değerinde engelleyerek en yüksek antagonistik etkinlik gösteren türlerden *Bacillus mojavensis* KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep, *Bacillus cereus* KGT13en, *Bacillus atrophaeus* KGT7en ve *Bacillus atrophaeus* KGA29ep izolatların tamamı 1.05-1.95 değerleri arasında değişen siderofor oluşturdıkları tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). de los Santos-Villalobos ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, mango kök bölgesinden izole edilen ve tanımlanan *Burkholderia cepacia* XXVI izolatının antaknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in misel gelişimi >%90 düzeyinde engellendiği, engellemede rol oynayan etki mekanizmasının besi yeri üzerinde üretilen antimikrobiyal peptidlerin yanı sıra hydroxamate tipinde siderofor üretiminden kaynaklandığı bildirilmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda da gerek *Burkholderia cepacia* XXVI izolatının gerekse ürettikleri hydroxamate tipinde siderofor'un yüksek antifungal etkinlik göstermesi, her ikisininde hastalıkla biyolojik mücadelede etkili bir şekilde kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

Antagonist bakteriler tarafından üretilen ve fungal hastalık etmenlerinin hücre duvarı yapısında bozulmalara ve erimelere neden olan preolitik enzimlerden proteaz enzim üretimi %2 yağı alınmış süt tozu içeren LB besi yerinde oluşturulan engelleme zonunun bakteri çapına oranlanmasıyla belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da ve Şekil 4.5B'de gösterilmiştir. Test edilen 42 izolattan 25 izolatın 1.05-2.09 indeks değerleri arasında değişen oranda proteaz enzimi ürettikleri kantitatif olarak belirlenmiş olup, farklı türlerin veya aynı türe bağlı izolatlar proteaz oluşturma açısından istatistiksel olarak birbirlerinden önemli düzeyde farklılık gösterdikleri gözlenmiştir. Çizelge 4.6'da görüleceği gibi, bakteri izolatları arasında en yüksek proteaz enzimi 2.09 indeks değeri ile *Serratia proteamaculans* KGT34en izolatı tarafından oluşturulmuş olup, bu izolatı sırasıyla 1.95 değeri ile *Bacillus megaterium*

KGT21, 1.76 değerleri ile *Bacillus cereus* KGT16en ve *Bacillus simplex* KGT23en izolatları takip etmiştir.

Test edildikleri fungal etmenin misel gelişimini >%70 değerinde engelleyerek en yüksek antagonistik etkinlik gösteren türlerden *Bacillus mojavensis* KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep, *Bacillus cereus* KGT13en, *Bacillus atrophaeus* KGT7en ve *Bacillus atrophaeus* KGA29ep izolatların tamamı 1.09-1.44 değerleri arasında değişen indeks değerlerinde proteaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

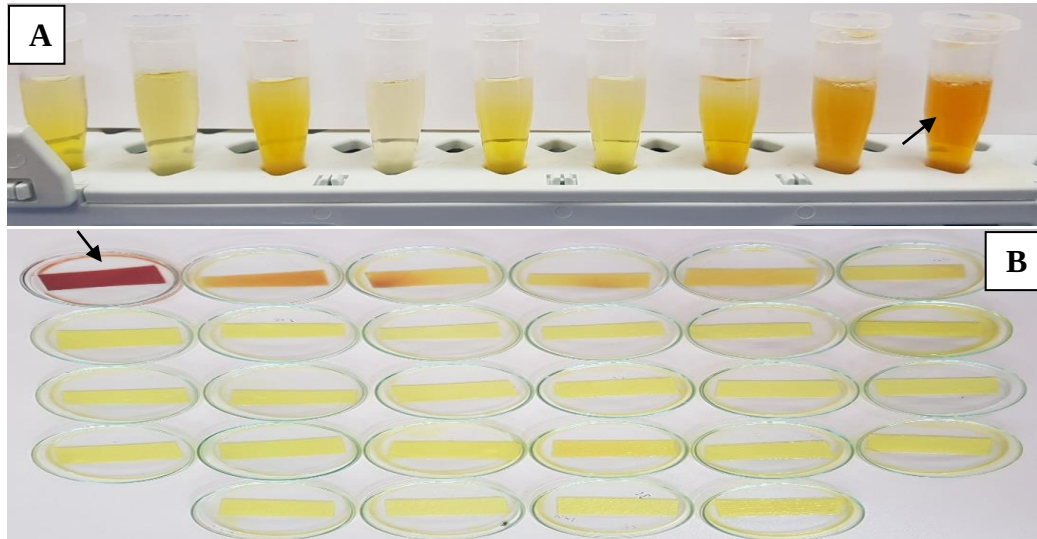


Şekil 4.5. Farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının siderofor (A) ve proteolitik (proteaz) enzim üretme(B) potansiyelleri. Bakteri kolonileri (*) etrafında oluşturulan engelleme zonlarının (ok) genişliği test edilen antagonist bakteri izolatının etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir

Bakteri izolatların bir diğer antagonistik etki mekanizmalarından olan uçucu bileşiklerden amonyak (NH_3) oluşturma potansiyelleri, peptonlu su içinde gelişen bakteri süspansiyonu üzerine Nessler's çözeltisi eklenmek suretiyle belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 2013). Besi yeri içerisinde bakterilerce oluşturulan amonyak üretimi tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan kahverengi-koyu sarı renge dönüşmesiyle kalitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6A). Çizelge 4.6'da görüleceği gibi aralarında yüksek oranda (%72.22-82.78) antagonistik etkinlik gösteren *Bacillus mojavensis* KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep, *Bacillus atrophaeus* KGT7en, *Bacillus cereus* KGT13en ve *Pseudomonas chlororaphis*

KGT10ep izolatlarının bulunduğu 29 bakteri izolatın tamamı besi yeri içerisinde değişen konsantrasyonlarda amonyak ürettikleri belirlenmiştir.

Bakteri izolatların bir diğer antagonistik etki mekanizmalarından olan HCN üretimi, glycine içeren besi yerinde gelişen bakteri hücreleri tarafından üretilen uçucu HCN bileşeni Petri kapağında bulunan ve pikrik asit ile ıslatılmış filtre kâğıdı renginin sarı renkten kahverengi veya koyu kırmızıya dönüşmesi şeklinde ortaya çıkan renk değişiklik şiddetine göre (Şekil 4.6B) kalitatif olarak belirlenmiştir (Castric, 1977). Çizelge 4.6’da görüleceği gibi, farklı düzeylerde antagonistik etkinlik gösteren türleri temsil eden 30 izolat arasında sadece 6 izolatın değişen şiddetlerde HCN ürettiği belirlenmiştir. Test edilen izolatlar arasında en yüksek HCN üretimi antagonistik etkinliği %72.22 gibi oldukça yüksek izolatlardan olan *Pseudomonas chlororaphis* KGT10 tarafından üretilirken bu izolatı bir diğer güçlü antagonistik etkiye sahip olan *Serratia proteamaculans* KGT34en, *Klebsiella oxytoca* KGA30ep, *Bacillus pseudomyoides* KGT22ep, *Bacillus megaterium* KGT39ep izolatları izlemiştir. Aralarında yüksek oranda antagonistik etkinlik gösteren *Bacillus mojavensis* KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep ve *Bacillus atrophaeus* KGT7en izolatların HCN üretmedikleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının amonyak (A) ve HCN üretme(B) potansiyelleri. Besi yerinin açık sarıdan koyu kahverengiye dönmesi (ok), petri içindeki filtre kağıdının sarı renkten kırmızı-kahverengiye (ok) dönmesi test edilen antagonist bakteri izolatının etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir

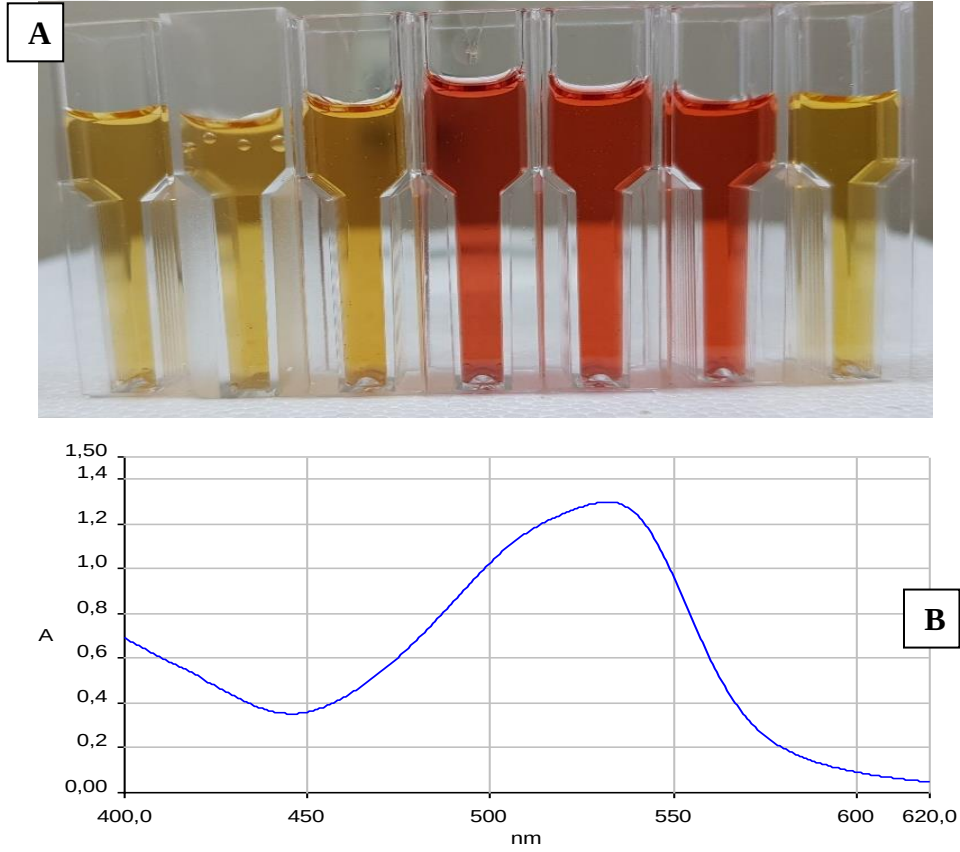
Yapılan önceki çalışmalarda, antagonist bakteri izolatı *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*'nın soya fasulyesinde kömür çürüklüğü hastalık etmenine (*Macrophomina phaseolina*) karşı bitki gelişimini teşvik eden mekanizmaların yanısıra antimikrobiyal etkinlik gösteren phenazin, phenazin türevleri ve HCN üretimini tetikleyen genlere sahip olduğunu bildirilmiştir (Rovera ve ark., 2014). Zhang ve ark., (2015), tarafından yapılan bir diğer çalışmada, patates yumru ve toprakları ile soya fasulyesi yapraklarından elde edilen *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas* spp. olarak tanımlanan 13 farklı bakteri izolatının 10 farklı toprak kökenli fungal hastalık etmenine karşı değişen oranlarda ve yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösterdiğinin, antagonist bakteri türlerinin gösterdiği antifungal etkinliklerden sorumlu farklı HCN, siderophores, β -1,3-glucanases, chitinases, proteases gibi antimikrobiyal bileşikler yanısıra, değişen oranlarda IAA, salicylic acid, azot fiksasyonu ve fosforu çözme etkinliklerinin de gösterdiklerini bildirmişlerdir.

4.4.4. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Bitki Büyüme Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi

Denemelerde antagonistik etkinlikleri belirlenen bakteri izolatların bitki büyümesini teşvik etmekten sorumlu olabilecek olası etki mekanizmalarından indol asetik asit (IAA) üretme potansiyelleri, L-tryptophane içeren LB sıvı besisi içinde inokulasyondan 4 gün sonra standart IAA absorbans değerlerine kıyaslanmak suretiyle ppm ($=\mu\text{g/ml}$) düzeyinde kantitatif olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 3.10F, Şekil 4.7).

Çizelge 4.7'da görülebileceği gibi test edilen 29 izolatın tamamı 2.84-80.56 $\mu\text{g/ml}$ aralığında değişen konsantrasyonlarda IAA üretmiştir. Antagonistik etkinlikleri nispeten düşük olan (%34.22-50.56) izolatlardan *Serratia proteamaculans* KGT34en, *Enterobacter cloacae* KGA50en ve *Lactobacillus brevis* KGT41ep izolatlarının en yüksek konsantrasyonlarda (68.06-80.56 $\mu\text{g/ml}$) IAA ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.7 ve Çizelge 4.7). Yapılan analizler sonucunda aynı cinse ait farklı bakteri türlerinin izolatları tarafından üretilen IAA konsantrasyon değerleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bakteri izolatları içerisinde nispeten yüksek düzeyde

(24.33 $\mu\text{g/ml}$) IAA üreten *Bacillus atrophaeus* KGA40en izolatının aynı zamanda fungal hastalık etmenlerine karşı %64.44 oranında oldukça güçlü bir antagonistik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Benzer şekilde en yüksek antagonistik etkiye sahip izolatlardan olan *Paenibacillus polymyxa* KGT45, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12, *Bacillus atrophaeus* KGT7en, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ve *Bacillus mojavensis* KGT1 izolatlarının 11.82-16.79 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda IAA ürettikleri belirlenmiştir. Test edilen bakteriler arasında, endofit bakteri izolatların IAA üretme potansiyelinin epifit türlere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Test edilen 29 izolattan13 endofit izolatın ortalama IAA konsantrasyonu 17.56 $\mu\text{g/ml}$ iken, 16 farklı epifit bakteri izolatın ortalama IAA konsantrasyonu 15.39 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının sıvı besi yerinde indol asetik asit (IAA) üretme potansiyelleri. (A) Sıvı besi yerinin sarıdan kırmızıya dönmesi test edilen antagonist bakteri izolatının IAA üretme etkinliğinin yüksek olduğunu gösterir. (B) *Serratia proteamaculans* KGT34en izolatı tarafından üretilen IAA miktarının 535 nm dalga boyundaki absorbans spektrasi

Çizelge 4.7. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların bitki gelişimini teşvik eden IAA ve fosforu çözme potansiyeller

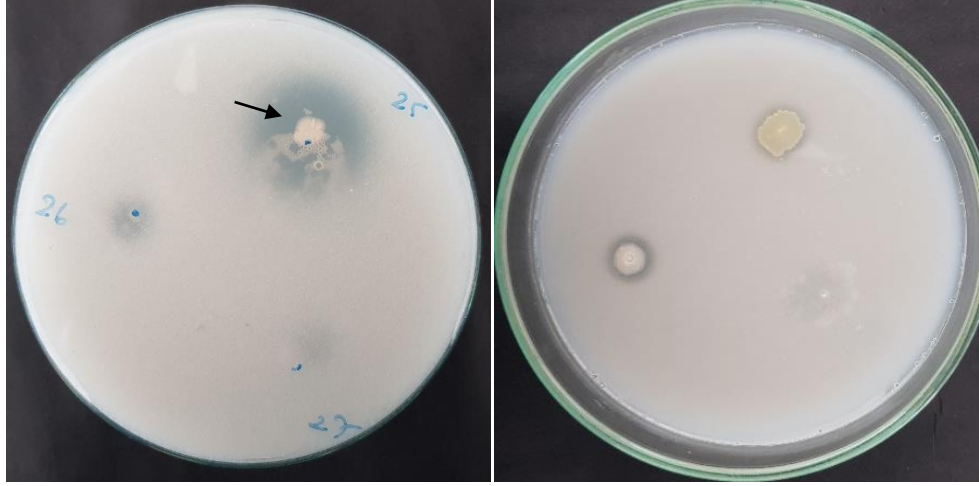
<i>Bakteri İzolatı</i>	IAA ^a	Fos-İnd*
1 <i>Enterobacter cloaceae</i> KGA50en	76.80 ^m	
2 <i>Chyseeobacterium scopthalmum</i> KGA46en	nt	nt
3 <i>Serratia proteamaculans</i> KGT34en	80.56 ⁿ	1.36 ^b
4 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> KGT10ep	14.13 ^{gh}	1.14 ^b
5 <i>Klebsiella oxytoca</i> KGA30ep	nt	1.19 ^b
6 <i>Bacillus mojavensis</i> KGT1ep	11.82 ^{fg}	0.00 ^a
7 <i>Pseudomonas koreensis</i> KGT47en	nt	nt
8 <i>Lelliottia amnigena</i> KGA38en	2.84 ^a	1.27 ^b
9 <i>Bacillus amyloliquefaciens_ssp_plantarum</i> KGA33ep	7.49 ^{cd}	0.00 ^a
10 <i>Jantionobacterium lividum</i> KGA48en	3.55 ^{ab}	0.00 ^a
11 <i>Pantoea aglomerans</i> KGT35en	18.27 ⁱ	2.15 ^c
12 <i>Bacillus thurigiensis</i> KGT15ep	5.90 ^{b-d}	0.00 ^a
13 <i>Lactobacillus plantarum</i> KGT42ep	10.32 ^{ef}	2.89 ^d
14 <i>Staphylococcus warneri</i> KGA28ep	8.26 ^{de}	1.45 ^b
15 <i>Bacillus cereus</i> KGT13en	3.81 ^{ab}	0.00 ^a
16 <i>Bacillus pseudomyoides</i> KGT22ep	10.18 ^{ef}	0.00 ^a
17 <i>Lactobacillus brevis</i> KGT41ep	68.06 ^l	2.14 ^c
18 <i>Cronobacter sp.</i> KGT51ep	nt	nt
19 <i>Bacillus pumilus</i> KGA37ep	3.48 ^{ab}	0.00 ^a
20 <i>Paenibacillus polymyxa</i> KGT45ep	16.79 ^{hi}	
21 <i>Lysinibacillus sphaericus</i> KGT3en	6.85 ^{cd}	0.00 ^a
22 <i>Bacillus simplex</i> KGA31en	7.09 ^{cd}	0.00 ^a
23 <i>Bacillus megaterium</i> KGT11ep	nt	nt
24 <i>Bacillus pumilus</i> KGT4en	5.54 ^{a-d}	1.20 ^b
25 <i>Bacillus megaterium</i> KGT21	4.78 ^{a-c}	0.00 ^a
26 <i>Sacharomyces cerevisiae</i> KGT43ep	42.01 ^k	2.76 ^d
27 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KGT12ep	16.49 ^{hi}	0.00 ^a
28 <i>Bacillus atrophaeus</i> KGA40en	24.33 ^j	0.00 ^a
29 <i>Rhizobacterium radiobacter</i> KGT52ep	nt	nt
30 <i>Bacillus pumilus</i> KGT6ep	nt	nt
31 <i>Bacillus megaterium</i> KGT39ep	7.37 ^{cd}	1.13 ^b
32 <i>Acinetobacter schindleri</i> KGA32en	4.01 ^{ab}	1.50 ^b
33 <i>Bacillus atrophaeus</i> KGT7en	15.94 ^{hi}	0.00 ^a
34 <i>Bacillus mojavensis</i> KGT17en	nt	nt
35 <i>Bacillus cereus</i> KGA26ep	nt	nt
36 <i>Bacillus subtilis</i> KGT2ep	4.98 ^{a-c}	0.00 ^a
37 <i>Bacillus cereus</i> KGT16en	nt	nt
38 <i>Bacillus mojavensis</i> KGT5ep	3.63 ^{ab}	0.00 ^a
39 <i>Bacillus atrophaeus</i> KGA29ep	nt	nt
40 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KGA27ep	nt	nt
41 <i>Bacillus mycoides</i> KGT8en	nt	nt
42 <i>Bacillus cereus</i> KGT18ep	nt	nt
43 <i>Bacillus cereus</i> KGA44en	5.23 ^{a-c}	nt
44 <i>Bacillus simplex</i> KGT23	nt	nt

^a Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı küçük harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)

Badem ağaçları ve tıbbi bitkilerden izole edilmiş ve bitki büyümesini teşvik eden özelliklerini belirlemeye yönelik yapılmış önceki çalışmalarda farklı *Enterobacter* spp. (*Enterobacter cloacae* ssp. *cloacae* ve *Enterobacter cloacae* ssp. *dissolvens*) ait izolatların, oldukça önemli düzeyde IAA üretmelerinin yanısıra hastalık etmeni *Macrophomina phaseolina*'ya karşı misel gelişimlerini engellemek suretiyle antagonsitik etkide bulunduğu bildirilmiştir (Rani ve Reddy, 2011; Ullah ve ark., 2017; Aktan ve Soylu, 2020; Khan ve ark., 2020).

Zhang ve ark. (2015), tarafından yapılan bir diğer çalışmada, patates yumru ve toprakları ile soya fasulyesi yapraklarından elde edilen *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas* sp. olarak tanılanan 13 farklı bakteri izolatının 10 farklı toprak kökenli fungal hastalık etmenine karşı değişen oranlarda ve yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösterdiğinin, antagonist bakteri türlerinin gösterdiği antifungal etkinliklerden sorumlu farklı HCN, siderophores, β -1,3-glucanases, chitinases, proteases gibi antimikrobiyal bileşikler yanı sıra değişen oranlarda IAA, salicylic acid, azot fiksasyonu ve fosforu çözme etkinliklerinde gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Test edilen 27 farklı bakteri izolatın fosforu çözme potansiyelleri ise tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri üzerinde bakterilerin ürettiği enzimler sonucu tri kalsiyum fosfatın çözülmesiyle oluşturdıkları engelleme zonlarının (Şekil 3.10E) bakteri çapına kıyaslanmasıyla hesaplanmış indeks değerleri ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de olarak verilmiştir. Çizelge 4.7'de gösterildiği gibi test edilen 27 izolattan 15 tanesi (%55.6) PVK besiyeri üzerinde fosfor çözme etkinliği göstermediği belirlenirken (Çizelge 4.7) 12 izolatın 1.13 ile 2.89 arasında değişen çözünürlük indeks değerlerinde fosforu çözme potansiyeline sahip izolatlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).

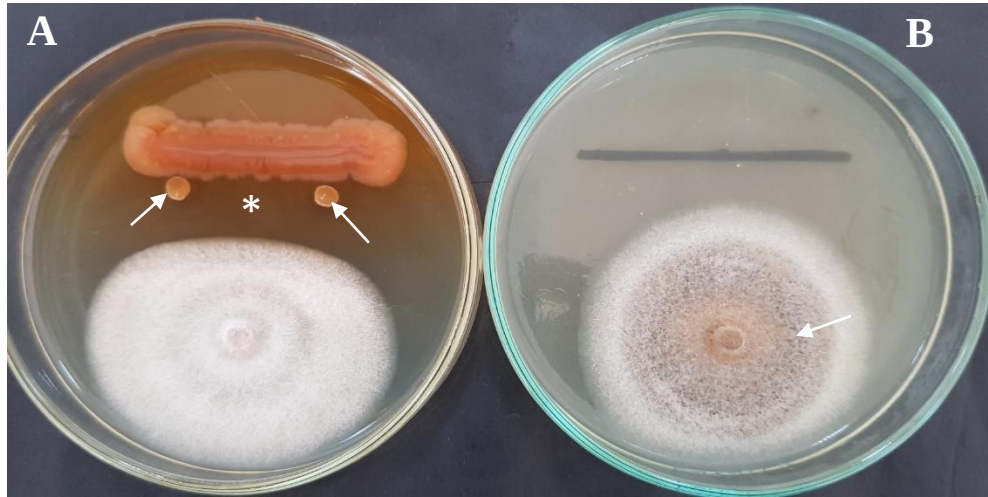


Şekil 4.8. Farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının fosforu çözme potansiyelleri. Bakteri kolonileri etrafında oluşturulan engelleme zonlarının (ok) genişliği test edilen antagonist bakteri izolatının etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir

Test edilen tüm izolatlar arasında en fazla fosfor çözen (engelleme bölgesi çapı en fazla olan) bakteri izolatların 2.14-2.89 aralığında çözünürlük indeks değerleri ile *in vitro* orta düzeyde antagonistik etkinlik gösteren izolatlardan *Lactobacillus plantarum*KGT42ep, *Sacharomyces cerevisiae* KGT43ep, *Pantoea aglomerans* KGT35enve *Lactobacillus brevis* KGT41ep izolatları olmuştur (Çizelge 4.7). İzolatlar arasında fosforu çözme aktivitesi bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılıklar tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Test edilen izolatlara arasında, güçlü antagonistik etkinlik gösteren (%72.22) *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep izolatının aynı zamanda fosforu çözme (1.14) yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Diğer güçlü antagonistik etkinlik gösteren *Bacillus* spp. içerisinde sadece *B. pumilus* KGT4en izolatının fosfor çözmede etkinlik gösterirken diğer etkili antagonist izolatlardan *Bacillus mojavensis* KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep, *Bacillus atrophaeus* KGT7enve *Bacillus cereus* KGT13en izolatları fosfor çözme etkinliği göstermediği belirlenmiştir. Rokhbakhsh-Zamin ve ark. (2011) *Pennisetum glaucum* bitkilerinkök bölgelerinden izole edip tanıladıkları 31 farklı *Acinetobacter* spp. ait izolat arasından 26 izolatın bitki gelişimini teşvik etmede IAA üretmelerinin yanı sıra fosfor ve çinko elementlerini çözme ve hydroxamate ve catechol tiplerde siderofor üretmek suretiyle bitki büyümesini önemli düzeyde teşvik ettiğini bildirilmiştir.

4.4.5. Antagonist Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engelleyen Bölgelerinin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi

Fungal etmene karşı antagonistik etkinliği test edilen *Bacillus mojavensis* KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep, *Bacillus atrophaeus* KGT7en, *Bacillus cereus* KGT13en, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep gibi izolatların yer aldığı petrilerdebakteri ile fungusun miseli arasında kalan engelleme bölgesine difüze olan bakteri hücresi tarafından üretilen antifungal bileşiklerin fungisidal veya fungistatik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taze fungal kültürden alınan sağlıklı misel diskleri yerleştirilerek tekrar inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 4.9). Fungal disklerden herhangi bir gelişmenin görülmemesi, antagonist bakteri tarafından üretilen bileşik(ler)in etkinliğinin fungusidal özellikte olduğunu göstermiştir (Şekil 4.9A). Kontrol petrilerinde grimsi-beyaz fungus kolonisi içerisinde tipik silindirik konidi ve acervulus yatakları oluşurken (Şekil 4.9B)antagonist bakterilerin bulunduğu petrilerde nispeten daha beyaz görünüşte misel kitlesi ve konidisi oluşurken, acervulus yataklarının oluşmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.9A).



Şekil 4.9. Engelleme bölgesinde *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep izolatu tarafından biriken bileşiklerin fungusidal etkinliğinin belirlenmesi. Engelleme bölgesindeki (*) misel disklerinden (ok) gelişme görülmemesi bu bölgelerde üretilen bileşiklerin fungusidal etkinliğini göstermektedir. Kontrol petrisinde (B) acervulus yatakları (ok) gelişmiş olup, bakteri izolatının bulunduğu petrilerde (A) acervulus yatakları oluşmamıştır

4.4.6. Antagonist Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

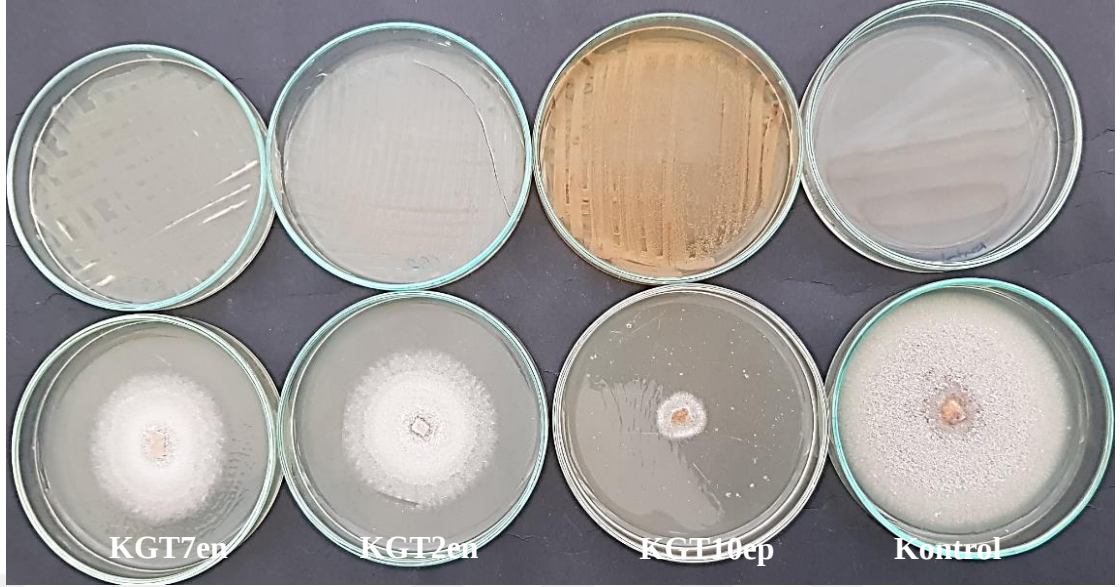
In vitro etkinlik çalışmalarında fungal etmenlerin misel gelişimini etkili şekilde engelleyen farklı *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerine ait izolatlar (*Pseudomonas chlororaphis*KGT10ep, *Bacillus subtilis*KGT2ep, *Bacillus atrophaeus* KGT7en) tarafından olası uçucu bileşenlerin antifungal etkinliği birbirlerine temas etmeyecek şekilde tasarlanmış ikili kültür testleri ile belirlenmiştir. Çalışmalarda kullanılan bakteriyel izolatlar arasında her 3 fungal hastalık etmenine karşı en yüksek antagonistik etkinlik *Pseudomonas chlororaphis*KGT10ep izolatı tarafından gösterilmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.10). *Pseudomonas chlororaphis* KG10ep izolatı tarafından üretilen uçucu bileşenler *C. karstii*'nin misel gelişimini %79.0 oranı gibi oldukça yüksek düzeyde engellemiştir. *Bacillus subtilis*KGT2ep ve *Bacillus atrophaeus* KGT7en izolatlarının ise antagonistik etkinlikleri daha önceki ikili kültür testlerinde gözlenen yüksek etkinlik oranlarına (%72.2-75.0) kıyasla, uçucu bileşenlerin etkinliği %31.5-36.2 gibi nispeten düşük düzeylerde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Farklı antagonist bakteri izolatların uçucu bileşenlerinin *in vitro* ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin radyal misel gelişimi (mm) üzerine etkinliği

Antagonist bakteri izolatları	İkili kültür difüze bileşenlerin etkinliği		İkili kültür uçucu bileşenlerinin etkinliği	
	MG (mm)	MGE (%)	MG (mm)	MGE (%)
Kontrol	60.00c	-	85.67d	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> KGT10ep	16.67b	72.2	18.0a	79.0
<i>Bacillus subtilis</i> KGT2ep	15.00a	75.0	58.67b	31.5
<i>Bacillus atrophaeus</i> KGT7en	16.67b	72.2	54.67c	36.2

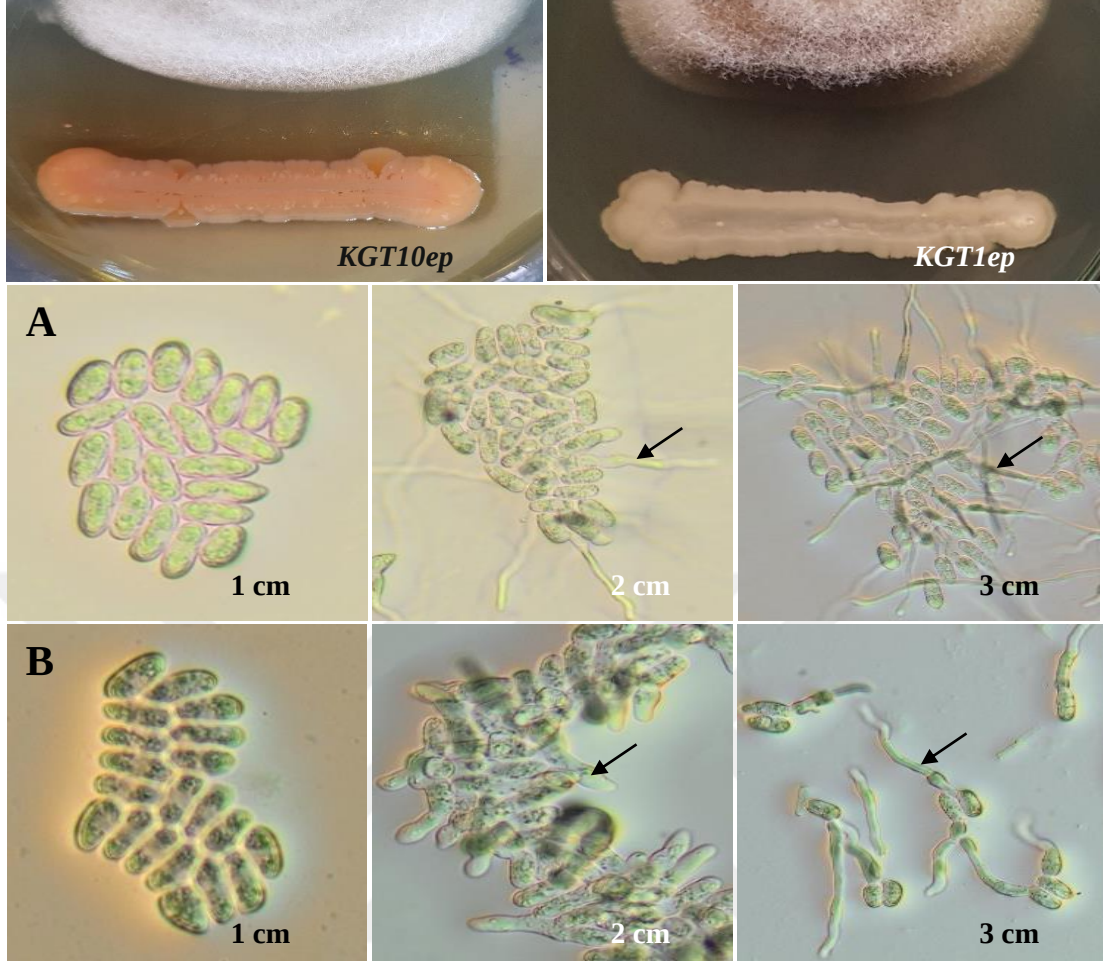
MG: Misel gelişimi (mm); **MGE:** Misel gelişiminin engellenme oranı (%)

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli olduğunu gösterir ($P < 0.05$).



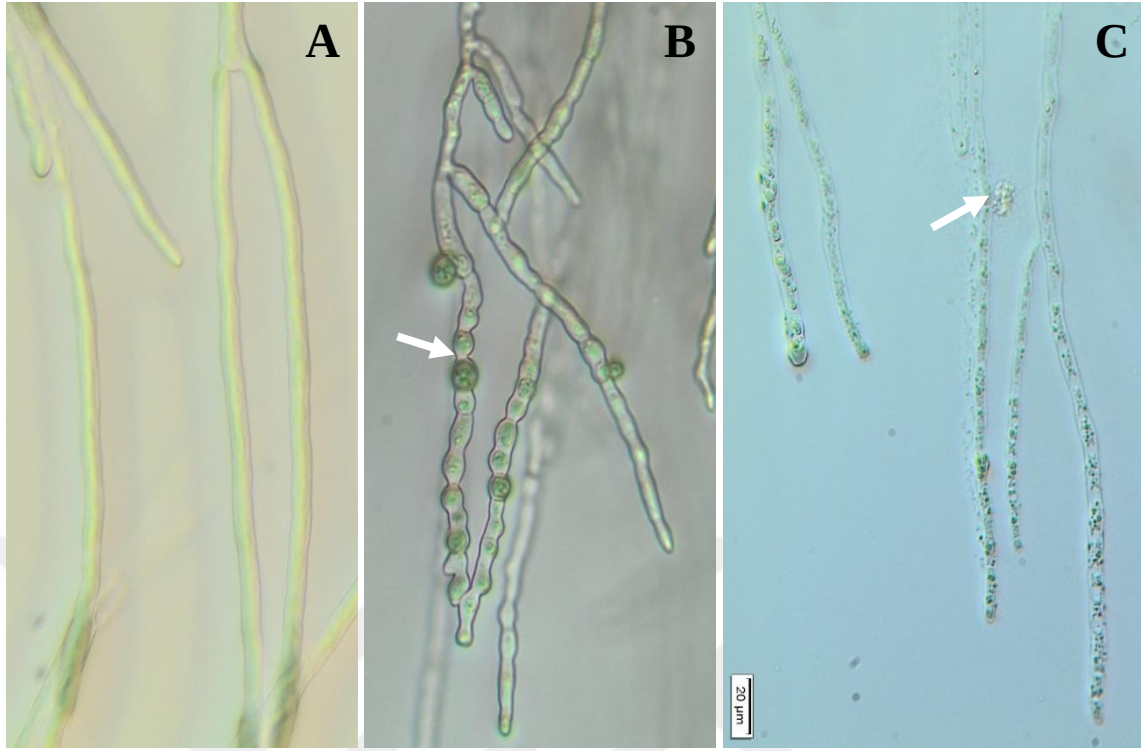
Şekil 4.10. Farklı antagonist bakteri izolatlarının uçucu bileşenlerin ikili kültür testleri ile antifungal etkinliklerinin belirlenmesi. Üst petri kapaklarına çizili *Bacillus atrophaeus* KGT7en, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep izolatlarının uçucu bileşenleri alt petrideki PDA besiyerinde misel gelişimlerini değişen oranlarda engellemiştir

İkili kültür testlerinde etkinliği yüksek bakteri izolatları arasından seçilen *Bacillus mojavensis* KGT1ep ve *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep izolatlarının besi yerinde ürettikleri ve difüze olan bileşen(ler)in spor canlılığı üzerine olan antifungal etkinlikleri *Bacillus mojavensis* KGT1ep ve *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep koloniden 1, 2 ve 3 cm uzaklıklara yayılan konidiler üzerinde incelenmiştir (Şekil 4.11). Her iki bakteri izolatu tarafından sentezlenen ve besi yerine difüze eden engelleme alanlarında koloniden 1 cm uzaklığa kadar mesafede sporların çimlenmesi %100 oranında engellendiği gözlenmiştir. Bakteri kolonisinden 2 ve 3 cm uzaklıklardaki alanlarda yapılan gözlem ve sayımlarda konidi çimlenme oranlarının 2 cm uzaklıkta %20-30, 3 cm uzaklıkta %75-85 oranlarda olduğu tespit edilmiştir. Çimlenen sporların çim borucuğu uzunluklarının bakteri kolonisinden uzaklaştıkça arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. (A) *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep ve (B) *Bacillus mojavensis* KGT1ep izolatları tarafından sentezlenen bileşik(ler)in *C. karstii* sporlarının çimlenmesi (ok) üzerine antagonistik etkinliğinin belirlenmesi. Antagonistik etkinlik koloniden 1, 2 ve 3 cm uzaklıklara yayılan konidiler üzerinde incelenmiştir

Antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen kimyasal bileşenlerin engelleme bölgesine yakın noktalarda fungal etmenin hifleri üzerinde neden oldukları morfolojik değişiklikler doğrudan engellemelerin gözlemlendiği petrilerde (Şekil 3.8) ışık mikroskobu ile yapılan gözlemlerle belirlenmiştir. *In vitro* ikili kültür testlerde yüksek oranda antagonistik etkinlik gösteren antagonist bakteri izolatlarından *Bacillus mojavensis* KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep fungal etmenin misel gelişimini engellediği bölgenin hemen yanındahiflerde şeffaf veya kararma şeklinde erime belirtileri gösterdiği, bu tür hifler mikroskop altında incelendiğinde boğumlaşma (Şekil 4.12B), sitoplazmik içeriklerinde pıhtılaşma ve hifduvarlarının erimelerinden kaynaklanan sitoplazmik içeriğin dışarıya boşalması (Şekil 4.12C) gibi morfolojik deformasyonlar gözlenmiştir.



Şekil 4.12. *C. karstii*'nin misel gelişimlerinin engellendiği ikili kültür petrilerinde hifler üzerinde gözlenen morfolojik deformasyonlar. (A) Kontrol petride gelişen sağlıklı hif. (B) *Bacillus mojavensis* KGT1epve (C) *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep izolatları tarafından oluşturulan engelleme bölgesine yakın noktalardaki hiflerde boğumlaşma (B), koagülasyon ve sitoplazmik içeriğin dışarı boşalması (C) şeklinde ortaya çıkan morfolojik anormallikler (ok)

Yapmış olduğumuz *in vitro* ikili kültür testlerinde fungal hastalık etmeni *C. karstii*'nin misel gelişimini en yüksek düzeyde engelleyen *Bacillus mojavensis* KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep, *Bacillus atrophaeus* KGT7en, *Bacillus cereus* KGT13en, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep ve *Bacillus atrophaeus* KGA29ep gibi endofit/epifit bakteri izolatların *in vitro* biyoetkinlik/bitki gelişimini teşvik edici mekanizmaları birlikte değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da sunulmuştur. Çizelgede görüldüğü gibi, hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeyde biyoetkinlik gösteren izolatların tamamı *in vitro* koşullarda antagonistik/bitki gelişimini teşvik edici mekanizmalardan bir veya birkaçını birlikte kullanmak suretiyle gerek hastalık etmenlerine karşı antagonistik etkinliğe, gerekse bitki gelişiminin teşvik edilmesinde potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. *C. karstii*'nin misel gelişimlerinin engellenmesi üzerine yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren endofit/epifit bakteri izolatların *in vitro* biyoetkinlik/bitki gelişimini teşvik edici mekanizmaları

Bakteri izolatı	MGE	Sid	Pro	NH ₃	HCN	IAA	Fosfor	Mik
<i>Bacillus mojavensis</i> KGT1ep	82.78	1.95	1.16	+++	-	11.8	0.0	+
<i>Bacillus subtilis</i> KGT2ep	75.00	1.05	1.09	+++	-	4.9	0.0	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KGT12ep	72.78	1.11	1.23	++	-	16.5	0.0	+
<i>Bacillus atrophaeus</i> KGT7en	72.22	1.08	1.15	+++	-	15.9	0.0	+
<i>Bacillus cereus</i> KGT13en	72.22	1.36	1.29	++	±	3.8	0.0	+
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> KGT10ep	72.22	2.10	1.44	+++	+++	14.1	1.1	+

MGE: misel gelişimini engelleme; Sid:siderofor; Pro: proteaz; NH₃:amonyak; HCN: hidrojen siyanür; IAA: indol asetik asit; Mik: mikroskopik düzeyde deformasyon; +: etkinlik kayıt edildi; -: etkinlik kayıt edilmedi

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, ülkemizde olduğu kadar diğer ülkelerde de mücadelesine yönelik oldukça kısıtlı sayıda çalışma yapılmış antraknoz etmeni *Colletotrichum karstii* ile kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlerden olan epifit ve endofit karakterli antagonist bakteriyel izolatlar ile bitki uçucu yağların antifungal etkinlikleri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. *C. karstii*'ye karşı biyolojik mücadele kapsamında sağlıklı turuncgil ve avokado meyve ağaçlarının farklı kısımlarından epifit ve endofit bakteri türlerinin izolasyonu, tanısı ve bakteriyel izolatların *in vitro* koşullarda antagonistik etkinliği ve hastalık etmenlerini engellemede rol oynayan olası etki mekanizmaları karakterize edilmiştir. Uçucu yağların misel gelişimini engellemede antifungal etkinliği buhar fazında araştırılmış, yapılan ışık mikroskobu çalışmalarıyla uçucu yağların fungisidal konsantrasyonlarda misel yapıları üzerinde oluşturdıkları morfolojik değişiklikler karakterize edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında ülkemiz dışında hastalığın bildirildiği diğer ülkelerde farklı antraknoz hastalık türlerine karşı bakteriyel ve fungal biyolojik mücadele etmenlerinin antifungal etkinliği araştırılmış olmakla birlikte, *C. karstii*'nin üzerine gerek fungal gerekse bakteriyel kökenli biyolojik mücadele etmenlerinin antifungal etkinliği konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Uçucu yağlar açısından yapılan literatür araştırmasında ise hastalık etmenin misel gelişiminin engellenmesi üzerine limon otu (*Cymbopogon citratus*) ve nane (*Mentha piperita*) bitki uçucu yağı ile yapılmış *in vitro* çalışmalar (de Oliveira ve ark., 2017; Oliveira ve ark., 2018) dışında uçucu yağların etkinliği üzerine yapılmış çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bağlamda, bitki uçucu yağlar ile antagonist bakteri izolatlarının turuncgiller ve avokado ağaçlarında son yıllarda sıkça bildirimi yapılan ekonomik öneme sahip hastalık etmeni *C. karstii*'ye karşı mücadele olanaklarının araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

Elde edilen sonuçlara göre, farklı bitki uçucu yağların buhar fazında *C. karstii*'nin misel gelişimini engellemesi üzerine olan antifungal etkinlik sonuçları değerlendirildiğinde en etkili uçucu yağların, 4.0-20 µl/petri dozlarla *T. spicata*, *O. syriacum*, *T. serpyllum*, *F. vulgare*, *L. citridora*, *M. aura* ve *O. majorana* uçucu yağları tarafından gösterilmiştir. Denemelerde kullanılan okaliptüs (*E. camaldulensis*) ve turunc (*C. aurantium*) uçucu yağının antifungal etkinliği 60.0-175.0 µl/petri doz gibi diğer

yağlarla kıyaslandığında oldukça yüksek dozda gösterilmiş olup, rezene bitkisine akraba olan çakşır (*F. communis*) uçucu yağı test edildikleri tüm dozlarda (100 µl/petri) fungal etmenin misel gelişimini engellemede etkili olamamıştır. Yapılan istatistik analiz sonucunda aynı yağa ait farklı uçucu yağ konsantrasyonları ile aynı dozda kullanılan farklı uçucu yağlar arasındaki farkında istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3). Bitki uçucu yağları arasında *T.spicata*, *O. syriacum* ve *F. vulgare*'nin misel gelişimini tamamen engelleyen fungisidal konsantrasyonlarda fungus miselleri üzerinde oldukça önemli morfolojik anormalliklere neden olduğu yapılan mikroskobik çalışmalarla belirlenmiştir. Fungal etmenin bu dozlarda gelişmeme sebebi uçucu yağların misellerin morfolojik yapılarında neden olduğu geri dönüşümsüz hücresel zararlanmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sağlıklı bitkilerin dış yüzeyleriyle içsel dokular birçok faydalı mikroorganizmalara konukçuluk eder. Bu bölgelerden izole edilen saprofit kökenli bitkilerde hastalık oluşturma yetisinde olmayan mikroorganizmalar ekonomik öneme sahip bitkilerde sorun olan fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılır. Çalışmamızda farklı bölgelerde yetişen sağlıklı turuncgil ve avokado meyve ağaçlarının farklı sağlıklı bitki kısımlarından yapılan izolasyonlar sonucunda insan ve bitki patojeni olmayan 20 tanesi endofit, 30 tanesi epifit karakterli 49 bakteri ve 1 maya izolatının fungal etmenlerin misel gelişimini engellemesi üzerine olan antagonistik etkinliğinin araştırıldığı çalışmamızda önceden yapılmış birçok biyolojik mücadele çalışmalarında bildirilen türlere benzer şekilde sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen en yaygın izolatların 32 adet ile *Bacillus* cinsine bağlı olduğu türlere ait izolatların olduğu, bunu sırası ile 2'şer izolatla *Pseudomonas* ve *Lactobacillus*, 1'er izolatla ise *Acinetobacter*, *Chyseobacterium*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Jantinobacterium*, *Klebsiella*, *Lelliottia*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Rhizobacterium*, *Sacharomyces*, *Serratia* ve *Staphylococcus* cinsleri takip etmiştir.

C. karstii'nin misel gelişimini en güçlü engelleyen ilk 3 izolatın, %72.78-82.78 engelleme oranı ile *Bacillus mojavensis*KGT1ep, *Bacillus subtilis* KGT2ep ve *Bacillus amyloliquefaciens* KGT12ep izolatının olduğu, bu izolatları %72.22-70.56 engelleme oranları ile *Bacillus atrophaeus* KGT7en, *Bacillus cereus* KGT13en ve *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep izolatları izlemiştir.

Bakteriler tarafından gösterilen antagonisitik etkinliğin bu bölgelerden alınan misel diskleri taze PDA besi yerine aktarıldığında bu hiflerin yeniden gelişemediği yine aynı zamanda engelleme bölgesine yerleştirilen sağlıklı misel disklerin çimlenmemesi antagonist bakteriler tarafından gösterilen engellemelerin fungusidal etkisinden kaynaklandığını göstermiştir.

Test edilen bakteri izolatları siderofor, proteaz, amonyak, HCN üretimi, fosfor çözme ve IAA, sentezleme bakımından istatistiksel olarak oldukça farklılıklar göstermiştir. Test edilen 38 izolatın tamamı siderofor, test edilen 42 izolattan 25 tanesi proteaz, test edilen 29 izolatın tamamı amonyak, test edilen 30 izolatın ise sadece 6 tanesi ise HCN üretiminde pozitif olarak kayıt edilmiştir.

Siderofor, proteaz ve amonyak üretiminin misel gelişimin engellenmesinde (antagonizm) rol oynayan faktörler olabileceği düşünülmektedir. *Enterobacter cloaceae* KGA50en, *Chyseeobacterium scophthalmum* KGA46en, *Serratia proteamaculans* KGT34en, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep, *Klebsiella oxytoca* KGA30ep ve *Bacillus mojavensis* KGT1ep izolatları en yüksek düzeyde siderofor; *Serratia proteamaculans* KGT34en, *Bacillus megaterium* KGT21ep, *Bacillus cereus* KGT16en, *Bacillus simplex* KGT23en, *Bacillus megaterium* KGT39ep, *Bacillus amyloliquefaciens* KGA27ep ve *Paenibacillus polymyxa* KGT45ep izolatları en yüksek düzeyde proteaz; *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep ve *Serratia proteamaculans* KGT34en izolatları en yüksek düzeyde amonyak; *Pseudomonas chlororaphis* KGT10ep, *Serratia proteamaculans* KGT34en, *Klebsiella oxytoca* KGA30ep, *Bacillus cereus* KGT13en, *Bacillus pseudomyoides* KGT22ep ve *Bacillus megaterium* KGT39ep izolatları da en yüksek düzeyde HCN üreten izolatlar olarak belirlenmiştir.

Test edilen 29 izolatın tamamı değişen konsantrasyonlarda (2.84-80.56 µg/ml) IAA üretmiş olduğu belirlenmiştir. *Serratia proteamaculans* KGT34en, *Enterobacter cloaceae* KGA50en ve *Lactobacillus brevis* KGT41ep izolatları en yüksek konsantrasyonda IAA üreten izolatlar olarak belirlenmiştir. Test edilen 27 izolat arasından 12 izolatın fosforu çözebilme yeteneğinde olduğu, izolatlar arasında *Lactobacillus plantarum* KGT42ep, *Sacharomyces cerevisiae* KGT43ep, *Pantoea agglomerans* KGT35en ve *Lactobacillus brevis* KGT41ep en yüksek fosfor çözme etkinliği gösteren izolatlar olmuştur.

Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde aynı türe ait bakteri izolatlar arasında fungus misellerinin engellenmesi arasındaki farklılıklar gözlenmiştir. Bu durumun antagonist bakteri izolatların izole edildikleri bitki örneğinin yetiştiği ortamdaki çevre koşullarının izolatların genetik çeşitliliğine etkide bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Epifitik ve endofitik kökenli bakterilerin toprak kökenli hastalık etmenlere karşı *in vitro* antagonitik etkinlik gösterdiği, hastalık etmenlerin engellemesinde antagonistik, parazitik ve PGPB etki mekanizmalarından bir veya birkaçını birden kullanmak suretiyle etkili olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak etmeni olarak kullanılan bakteriyel izolatlar entegre mücadele programı kapsamında pestisitlerin çevre üzerindeki olası olumsuzlukların azaltılmasında rol oynayabilirler. Güçlü antagonistik (siderofor, proteaz, amonyak üretimi) ve PGPB (IAA ve fosfor çözme) etkinlikleri gösteren, özellikle *Bacillus* spp. *Pseudomonas* spp. ve *Enterobacter* spp. ait izolatların pestisitlere alternatif biyokontrol etmeni olarak değerlendirilebileceği, test edilen toprak kökenli hastalık etmenlerinin baskılanmasında biyokontrol etmeni olarak geliştirilebilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma bitki uçucu yağların ve antagonist bakteri türlerinin ekonomik öneme sahip turunçgil ve avokado meyve ağaçlarında sorun olan antraknoz hastalık etmeni *C. karstii*'ye karşı biyokontrol etkinliğinin ve etki mekanizmalarının araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- Adams, R., 2001. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol stream, IL: Allured Publishing. Carol stream, IL.
- Ahmed, A.S., Perez-Sanches, C., Egea, C. and Candela, M.E., 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot by *Phytophthora capsici* in pepper plants. **Plant Pathology**, 48: 58-65.
- Aiello, D., Carrieri, R., Guarnaccia, V., Vitale, A., Lahoz, E., Polizzi, G., 2015. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. karstii* causing preharvest disease on *citrus sinensis* in Italy. **Journal of Plant Pathology**, 163: 168-177.
- Aktan, Z.C. ve Soylu, S., 2020. Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarından endofit ve epifit bakteri türlerinin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının karakterizasyonu. **KSU Tarım ve Doğa Dergisi**, 23: 641-654.
- Aktan, Z.C., 2018. Badem ağaçlarında kurumaya neden olan bazı fungal hastalık etmenleri ile mücadelede endofit bakterilerin kullanım olanaklarının araştırılması üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, **Mustafa Kemal Üniv. Fen Bilimleri Enst. Bitki Koruma Anabilim Dalı**.
- Alexander, S.A. and Waldenmaier C.M., 2002. Management of anthracnose in bell pepper. Fungicide and Nematicide Tests. **New Fungicide and Nematicide Data Committee of the American Phytopathological Society**, 58: 49.
- Alvindia, D.G. and Natsuaki, K.T., 2009. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. **Crop Protection**, 28: 236-242.
- Amaresan, N., Jayakumar, V., Thajuddin, N., 2014. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. **Indian Journal of Biotechnology**, 13: 247-255.
- Araujo, F.F., Henning, A.A. and Hungria, M., 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21: 1639-1645.
- Arslan, M. and Derviş, S., 2010. Antifungal activity of essential oils against three vegetative-compatibility groups of *Verticillium dahlia*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26: 1813–1821.
- Ayon, C.B.C., Esquivel, G.L., Velasco, C.R., Virgen, O.E., Arangure, A.B. and Campos, O.J.C., 2020. *In vitro* evaluation of antagonists against soursop fruit pathogens (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. **Revista Brasileira De Fruticultura**, 42: DOI:10.1590/0100-29452020147.
- Bacon, C.W., Hinton, D.M., Mitchell, T.R., Snook, M.E. and Olubajo, B., 2012. Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers. **Biological Control**, 62: 1-9.
- Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D. and Waomar, M., 2008. Biological effects of essential oils-A review. **Food Chem. Toxicol**, 46: 446-475.
- Bakthavatchalu, S., Shivakumar, S., Sullu, S.B., 2013. Molecular detection of antibiotic related genes from *Pseudomonas aeruginosa* FP6, an antagonist towards *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Turkish Journal of Biology**, 37: 289-295.

- Bernal, G., Illanes, A. and Ciampi, L., 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, (on line), 15 April 2002, 5. Available from <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue1/full/4/>
- Bianchi, A., Zambonelli, A., D'Aulerio, A.Z., Bellesia, F., 1997. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Plant Diseases**, 81:1241-1246.
- Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M., Chaabouni, M.M., Ben Aissa, R., Zgoulli, S., Thonart, R., Carlier, A., Marlier, M., Lognay, G.C., 2005. Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* L. oil from Tunisia. **Journal of Essential Oil Research**, 17: 584-586.
- Bower, J.P., Cutting, J.G., 1988. Avocado Fruit Development and Ripening Physiology. **Horticultural Reviews**, 229-271.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S., 2012. *Colletotrichum*, current status and future directions. **Stud Mycol.**, 73(1):181-213.
- Cappuccino, J.G. and Sherman, N., 2013. **Microbiology: A Laboratory Manual**. 10. Baski, Pearson Education Limited, Londra.
- Castric, P.A., 1977. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, 130: 826-831.
- Cavanagh, H.M.A., Wilkinson, J.N., 2002. Biological activities of lavender essential oil. **Phytotherapy Research**, 16: 301-308.
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., Kozo, A. and Lumyong, S., 2008. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. **Kmitl. Sci. Tech. J.**, 8: 18-23.
- Chung, S.H., Kong, H.S., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.D. and Roberts, D.P., 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soil borne pathogens of cucumber and pepper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 80: 115-123.
- Conrath, U., 2006. Systemic Acquired Resistance. **Plant Signal Behav**, 1(4): 179-184.
- Crane, A., 1989. Field Notes From Abroad-Israel. **California Avocado Society Yearbook**, 73: 137-139.
- Dalal, J.M. and Kulkarni, N.S., 2014. Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic actinomycetes of soybean (*Glycine max* (l) merril). **CIBTech Journal of Microbiology**, 3(4): 2319-3867.
- Damasceno, C.L., Duarte, E.A.A., dos Santos, L.B.P.R., de Oliveira, T.A.S., de Jesus, F.N., de Oliveira, L.M., Goes-Neto, A. and Soares, A.C.F., 2019. Postharvest biocontrol of anthracnose in bananas by endophytic and soil rhizosphere bacteria associated with sisal (*Agave sisalana*) in Brazil. **Biological Control**, 137: UNSP 104016. 10.1016/j.biocontrol.2019.104016.
- Damm, U., Cannon P.F., Woudenberg, J.H.C., Crous, P.W., 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, 73:37-113.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H., Johnston, P.R., Weir, B.S., Tan, Y.P., Shivas, R.G., Crous, P.W., 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Stud. Mycology**, 73: 1-36.
- Daoud, H.B., Baraldi, E., Iotti, M., Leonardi, P. and Boughalleb-M'Hamdi, N., 2019. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. causing citrus anthracnose in Tunisia. **Phytopathologia Mediterranea**, 58: 175-185.

- De Capdeville, G., Souza, M.T., Santos, J.R.P., Miranda, S.D.P., Caetano, A.R., Torres, F.A.G., 2007. Selection and testing of epiphytic yeasts to control anthracnose in post-harvest of papaya fruit. **Scientia Horticulturae**, 111: 179-185.
- De Costa, D.M., Zahra, A.R.F., Kalpage, M.D., Rajapakse, E.M.G., 2008. Effectiveness and molecular characterization of *Burkholderia spinosa*, a prospective biocontrol agent for controlling postharvest diseases of banana. **Biological Control**, 47: 257-267.
- de los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G.C., Miranda-Salcedo, M.A. and Pena-Cabriales, J.J., 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 28: 2615-2623.
- de Oliveira, K.A.R., Berger, L.R.R., de Araujo, S.A., Camara, M.P.S., de Souza, E.L., 2017. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. **Food Microbiology**, 66: 96-103.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol. Plant Pathol.**, 13(4): 414–430.
- Dimkic, I., Janakiev, T., Petrovic, M., Degrassi, G., Fira, D., 2022. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 117: 10.1016/j.pmpp.2021.101754.
- Dos Passos, J.F.M., da Costa, P.B., Costa, M.D., Zaffari, G.R., Nava, G., Boneti, J.I., de Oliveira, A.M.R., Passaglia, L.M.P., 2014. Cultivable bacteria isolated from apple trees cultivated under different crop systems: Diversity and antagonistic activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Genetics and Molecular Biology**, 37: 560-572.
- Douanla-Meli, C., Unger, J.G., 2017. Phylogenetic study of the *Colletotrichum* species on imported citrus fruits uncovers a low diversity and a new species in the *Colletotrichum gigasporum* complex. **Fungal Biology**, 121: 858-868.
- FAO, 2019. FAOSTAT, Word Production Data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Erişim Tarihi: 28.12.2020)
- FAO, 2020. Word Crop Production Quantities. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>, Erişim Tarihi:15.07.2020
- Farr, D.F. and Rossman A.Y., 2020. Fungal databases. Systematic mycology and microbiology laboratory, USDA ARS. Retrieved from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (Erişim Tarihi: 27.01.2020)
- Ferreira, F.V., Herrmann-Andrade, A.M., Calabrese, C.D., Bello, F., Vazquez, D., Musumeci, M.A., 2020. Effectiveness of *Trichoderma* strains isolated from the rhizosphere of citrus tree to control *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* A21 resistant to pyrimethanil in post-harvest oranges (*Citrus sinensis* L. (Osbeck)). **Journal of Applied Microbiology**, 129: 712-727.
- Fiddaman, P.J. and Rossall, S., 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology**, 74(2): 119-26.
- Fiori, A.C.G., Schwan-Estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R., Vida, J.B., Scapim, C.A., Cruz, M.E.S., Pascholati, S.F., 2000. Antifungal activity of leaf extracts and

- essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, 148: 483-487.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, 43: 337-359.
- Glickman, E. and Y. Dessaux., 1995. A critical evaluation of the specificity of salkowski reagent for indole compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 793-796.
- Guardado-Valdivia, L., Tovar-Pérez, E., Chacón-López, A., López-García, U., Gutiérrez-Martínez, P., Stoll, A., et al., 2018. Identification and characterization of a new *Bacillus atrophaeus* strain B5 as biocontrol agent of postharvest anthracnose disease in soursop (*Annona muricata*) and avocado (*Persea americana*). **Microbiol Res**, 210: 26-32.
- Guarnaccia, V., Groenewald, J.Z., Polizzi, G., Crous, P.W., 2017. High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. **Persoonia**, 39: 32-50.
- Guerrero-Barajas, C., Constantino-Salinas, E.A., Amora-Lazcano, E., Tlalapango-Angeles, D., Mendoza-Figueroa, J.S., Cruz-Maya, J.A., Jan-Roblero, J., 2020. *Bacillus mycoides* A1 and *Bacillus tequilensis* A3 inhibit the growth of a member of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* species complex in avocado. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 100: 4049-4056.
- Gunasinghe, R.N., Ikiriwatte, C.J., Karunaratne, A.M., 2004. The use of *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp. to control banana pathogens. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 79: 1002-1006.
- Gunasinghe, W.K.R.N., Karunaratne, A.M., 2009. Interactions of *Colletotrichum musae* and *Lasiodiplodia theobromae* and their biocontrol by *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp. in expression of crown rot of "Embul" banana. **Biocontrol**, 54: 587-596.
- Gupta, C.P., Kumar, B., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2006. Chitinase mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. **BioControl**, 51: 821-835.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43: 895-914.
- Hu, W., Gao, Q., Hamada, M.S., Dawood, D.H., Zheng, J., Chen, Y. and Ma, Z., 2014. Potential of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain Pcho10 as a biocontrol agent against *Fusarium graminearum*. **Phytopathology**, 104: 1289-1297.
- Huang, C.J. and Chen, C.Y., 2004. Gene cloning and biochemical characterization of chitinase CH from *Bacillus cereus* 28-9. **Annals of Microbiology**, 54: 289-297.
- Huang, F., Chen, G.Q., Hou, X., Fu, Y.S., Cai, L., Hyde, K.D., Li, H.Y., 2013. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. **Fungal Diversity**, 61: 61-74.
- Huang, F., Chen, G.Q., Hou, X., Fu, Y.S., Cai, L., Hyde, K.D., Li, H.Y., 2013. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. **Fungal Diversity**, 61: 61-74.
- Hussain, A.L., Anwar, F., Rasheed, S., Nigam, P.S., Janneh, O., Sarker, S.D., 2011. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils

- from two *Origanum* species growing in Pakistan. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 21: 943-952.
- Huszcza, E. and Burczyk, B., 2006. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 61: 727-733.
- Jayakumar, V., Bhaskaran, R., Tsushima, S., 2007. Potential of plant extracts in combination with bacterial antagonist treatment as biocontrol agent of red rot of sugarcane. **Canadian Journal of Microbiology**, 53: 196-206.
- Ji, X.L., Lu, G.B., Gai, Y.P., Gao, H.J., Lu, B.Y., Kong, L.R., Mu, Z.M., 2010. Colonization of *Morus alba* L. by the plant-growth-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1. **BMC Microbiology**, 10: Article Number243.
- Jiang, H.X., Wang, X.H., Xiao, C.Z., Wang, W.Y., Zhao, X., Sui, J.K., Sa, R.B., Guo, T.L. and Liu, X.L., 2015. Antifungal activity of *Brevibacillus laterosporus* JX-5 and characterization of its antifungal components. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 31: 1065-1618.
- Kadri, A., Zarai, Z., Ben Chobba, I., Bekir, A., Gharsallah, N., Damak, M., Gdoura, R., 2011. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5: 5999-6004.
- Kara, M. and Soyulu, S., 2022. Isolation of endophytic bacterial isolates from healthy banana trees and determination of their in vitro antagonistic activities against crown rot disease agent *Fusarium verticillioides*. **Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi**, 27(1): 36-46.
- Kefialew, Y., Ayalew, A., 2008. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). **Postharvest Biology and Technology**, 50: 8-11.
- Khalil, R., Li, Z.G., 2011. Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. **African Journal of Biotechnology**, 10: 8397-8402.
- Khan, M.S., Gao, J., Zhang, M., Chen, X., Du, Y., Yang, F. and Zhang, X., 2020. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic bacteria *Bacillus stratosphericus* LW-03 from *Lilium wardii*. **3 Biotech**, 10: 1-15
- Khan, Z.U.D., Saeed, M.A., 2002. Antibacterial potentials of some constituents of *Lavandula stoechas* L. **Pakistan Journal of Botany**, 34: 359-366.
- Kim, G.H., Lim, M.T., Hur, J.S., Yum, K.J., 2009. Biological control of tea anthracnose using an antagonistic bacterium of *Bacillus subtilis* isolated from tea leaves. **Plant Pathology Journal**, 25: 99-102.
- Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R., Chi, Y.T., 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **Journal of Applied Microbiology**, 97: 942-949.
- Knight, Jr. R.J., 2002. History, Distribution and Uses. In Whiley, A.W., Schaffer, B., Wolstenholme, B.N. (Ed), *The Avocado: Botany, Production and Uses* (1-14). **Cabi Publishing, London**, 416 pp.
- Knobloch, K., Pauli, P., Iberl, B., Weigand, H., Weiss, N., 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, 1: 119-128.
- Koomen, I., Jeffries, P., 1993. Effects of antagonistic microorganisms on the postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. **Plant Pathology**, 42: 230-237.

- Korsten, L., DeJager, E.S., Devilliers, E.E., Lourens, A., Kotze, J.M., Wehner, F.C., 1995. Evaluation Of Bacterial Epiphytes Isolated From Avocado Leaf And Fruit Surfaces For Biocontrol Of Avocado Postharvest Diseases. **Plant Disease**, 79: 1149-1156.
- Kumar, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, 167: 493–499.
- Kumari, P., Khanna, V. and Kumar, P., 2017. Multifaceted rhizobacteria-mediated growth augmentation in chickpea. **Agric. Res.**, 6: 368–377.
- Kupper, K.C., Wickert, E., Aukar, A.P.A., Rivas, E., Goes, A., 2010. Genetic diversity of *Bacillus subtilis* isolates with potential to biological control of *Colletotrichum acutatum* and *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, 36: 195-202.
- Kurt, Ş., Uysal, A., Soylu, E.M., Kara, M. And Soylu S., 2020. Characterization and pathogenicity of *Fusarium solani* associated with dry root rot of citrus in the eastern Mediterranean region of Turkey. **Journal of General Plant Pathology**, 86(4): 326-332.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. (T.F. Preece, Editor). In: **Methods in Plant Pathology**, Black well Scientific Publications. Pp, 2: 176-177, Oxford.
- Lewis, I.M.L, Miller, S.A., 2003. Evaluation of Fungicides and a Biocontrol Agents for the Control of Anthracnose on Green Pepper Fruit, New Fungicide and Nematicide Data Committee of the American Phytopathological Society; 2003. p. 62.
- Manner, H.I., Buker, R.S., Smith, V.E., Ward, D., Elevitch, C.R., 2006. *Citrus* (citrus) and *Fortunella* (kumquat). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry: Ecological, Economic, And Cultural Renewal. <https://agroforestry.org/images/pdfs/Citrus-citrus.pdf>
- Marquez-Santacruz, H.A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M.C., VelazquezSepulveda, I. and Santoyo, G., 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. **Genetics and Molecular Research**, 9: 2372-2380.
- Mayorquin, J.S., Nouri, M.T., Peacock, B.B., Trouillas, F.P., Douhan, G.W., Kallsen, C., Eskalen, A., 2019. Identification, Pathogenicity, and Spore Trapping of *Colletotrichum karstii* Associated with Twig and Shoot Dieback in California. **Plant Disease**, 103: 1464-1473.
- Minija, J. and Thoppil, J.E., 2002. Studies on essential oil composition and microbicidal activities of two South Indian spices of the Apiaceae. **International Journal of Aromatherapy**, 12: 213-215.
- Mochizuki, M., Yamamoto, S., Aoki, Y., Suzuki, S., 2012. Isolation and characterisation of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 as a biological control agent for anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biocontrol Science and Technology**, 22: 697-709.
- Montiel, L.G.H., Rodriguez, R.Z., Angulo, C., Puente, E.O.R., Aguilar, E.E.Q., Galicia, R., 2017. Marine yeasts and bacteria as biological control agents against anthracnose on mango. **Journal of Phytopathology**, 165: 833-840.
- Nakamura, C.V., Ishida, K., Faccin, L.C., Filho, B.P.D., Cortez, D.A.G., Rozental, S., de Souza, W. and Ueda-Nakamura, T., 2004. In vitro activity of essential oil from

- Ocimum gratissimum L. against four Candida species. **Res. Microbiol.**, 155: 579–586.
- Oliveira, P.D.L., de Oliveira, K.A.R., Vieira, W.A.D., Camara, M.P.S., de Souza, E.L., 2018. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (DC ex Nees) Stapf. essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, 266: 87-94.
- Ortega-Morales, B.O., Ortega-Morales, F.N., Lara-Reyna, J., De la Rosa-Garcia, S.C., Martinez-Hernandez, A., Montero-M, J., 2009. Antagonism of *Bacillus* spp. isolated from marine biofilms against terrestrial phytopathogenic fungi. **Marine Biotechnology**, 11: 375-383.
- Osman, M.S., Sivakumar, D., Korsten, L., 2011. Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropane on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. **Crop Protection**, 30: 173-178.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 3795-3801.
- Peng, L.J., Yang, Y.L., Hyde, K.D., Bahkali, A.H., Liu, Z.Y., 2012. *Colletotrichum* species on Citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Cryptogamie Mycologie**, 33: 267-283.
- Perneel, M., Heyrman, J., Adiobo, A., De Maeyer, K., Raaijmakers, J.M., De Vos, P. and Höfte, M., 2007. Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. **Journal of Applied Microbiology**, 103: 1007-1020.
- Ramdial, H., De Abreu, K. and Rampersad, S.N., 2017. Fungicide sensitivity among isolates of *Colletotrichum truncatum* and *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex infecting bell pepper in Trinidad. **Plant Pathology**, 33: 118-124.
- Ramos, A.P., Talhinas, P., Sreenivasaprasad, S., Oliveira, H., 2016. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, as the main causal agent of citrus anthracnose, and *C.karstii* as species preferentially associated with lemon twig dieback in Portugal. **Phytoparasitica**, 44: 549-561.
- Rani, M.U. and Reddy, G., 2011. *Bacillus cereus* and *Enterobacter cancerogenus* screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of pigeon pea. **African Journal of Microbiology Research**, 5: 2090-2094.
- Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A., 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, 17: 359-364.
- Reyes-Estebanez, M., Sanmartin, P., Camacho-Chab, J.C., De la Rosa-Garcia, S.C., Chan-Bacab, M.J., Aguila-Ramirez, R.N., Carrillo-Villanueva, F., De la Rosa-Escalante, E., Arteaga-Garma, J.L., Serrano, M., Ortega-Morales, B.O., 2020. Characterization of a native *Bacillus velezensis*-like strain for the potential biocontrol of tropical fruit pathogens. **Biological Control**, 141: 104127.
- Reyes-Perez, J.J., Hernandez-Montiel, L.G., Vero, S., Noa-Carrazana, J.C., Quiñones-Aguilar, E.E., Rincin-Enriquez, G., 2019. Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango using the marine bacterium *Stenotrophomonas*

- rhizophila* and its possible mechanisms of action. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, 56: 4992-4999.
- Riera, N., Handique, U., Zhang, Y.Z., Dewdney, M.M., Wang, N.A., 2017. Characterization of antimicrobial-producing beneficial bacteria isolated from huanglongbing escape citrus trees. **Frontiers in Microbiology**, 8:10.3389/fmicb.2017.02415.
- Rokhbakhsh-Zamin, F., Sachdev, D., Kazemi-Pour, N., Engineer, A., Pardesi, K.R., Zinjarde, S.S., Dhakephalkar, P.K. and Chopade B.A., 2011. Characterization of Plant-Growth-Promoting Traits of *Acinetobacter* Species Isolated from Rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. **Journal of Microbiology Biotechnology**, 21: 556-566.
- Romagnoli, C., Bruni, R., Andreotti, E., Rai, M.K., Vicentini, C.B., Mares, D., 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. **Protoplasma**, 225: 57-65.
- Romero, F.M., Marina, M. and Pieckenstain, F.L., 2014. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, 351: 187-194.
- Rosenbluet, M. and Martinez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interact**, 19:827–837
- Rovera, M., Pastor, N., Niederhauser, M. and Rosas, S.B., 2014. Evaluation of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1 for growth promotion of soybean and for control of *Macrophomina phaseolina*. **Biocontrol Science and Technology**, 24: 1012-1025.
- Sangeetha, G., Thangavelu, R., Rani, S.U., Muthukumar, A., Udayakumar, R., 2010. Induction of systemic resistance by mixtures of antagonist bacteria for the management of crown rot complex on banana. **Acta Physiologiae Plantarum**, 32: 1177-1187.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M.C., Glick, B.R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, 183: 92-99.
- Sawant, I.S., Wadkar, P.N., Rajguru, Y.R., Mhaske, N.H., Salunkhe, V.P., Sawant, S.D., Upadhyay, A., 2016. Biocontrol potential of two novel grapevine associated *Bacillus* strains for management of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biocontrol Science and Technology**, 26: 964-979.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, 160: 47-56.
- Senthilkumar, M., Swarnlakshmi, K., Govindasamy, V., Lee, Y.K. and Annapurna, K., 2009. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus *Rhizoctonia bataticola*. **Current Microbiology**, 58: 288-293.
- Shahid, I., Rizwan, M., Baig, D.N., Saleem, R.S., Malik, K.A. and Mehnaz, S., 2017. Secondary Metabolites Production and Plant Growth Promotion by *Pseudomonas chlororaphis* and *P. aurantiaca* Strains Isolated from Cactus, Cotton, and Para Grass. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27: 480-491.
- Shastri, B., Kumar, R., Lal, R.J., 2020. Isolation, characterization and identification of indigenous endophytic bacteria exhibiting PGPR and antifungal traits from the internal tissue of sugarcane crop. **Sugar Tech.**, 22: 563-573.
- Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J. and Lou, K., 2014. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the 96

- north slope of Tianshan mountain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98: 6375-6385.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24: 1669-1679.
- Slininger, P.J., Schisler, D.A., Shea-Andersh, M.A., Sloan, J.M., Woodell, L.K., Frazier, M.J., Olsen, N.L., 2010. Multi-strain co-cultures surpass blends for broad spectrum biological control of maladies of potatoes in storage. **Biocontrol Science and Technology**, 20: 763-786.
- Sokovic, M., Glamoclija, J., Marin, P.D., Brkic, D., van Griensven, L.J.L.D., 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. **Molecules**, 15: 7532-7546.
- Soliman, K.M. and Badeaa, R.I., 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, 40: 1669–1675.
- Sonker, N., Pandey, A.K., Singh, P. and Tripathi, N.N., 2014. Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil as herbal preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, and antiochratoxin activities and *in vivo* efficacy during storage. **Journal of Food Science**, 79: Nr.
- Soylu, E.M., Kurt, S. and Soyly, S., 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, 143: 183-189.
- Soylu, E.M., Soyly, S., Kurt, S., 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, 161: 119-128.
- Soylu, S., Kara, M., Soyly, E.M., Uysal, A. ve Kurt, Ş., 2022. *Geotrichum citri-aurantii*'nin sebep olduğu turuncgil ekşi çürüklük hastalığının biyolojik mücadelesinde endofit bakterilerin biyokontrol potansiyellerinin belirlenmesi. **Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi**, 19: 177-191.
- Soylu, S., Kara, M., Uysal, A., Kurt, Ş. and Soyly, E.M., 2021. Determination of antagonistic potential of endophytic bacteria isolated from lettuce against lettuce white mould disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Zemdirbyste-Agriculture**, 108: 303-312.
- Soylu, S., Soyly, E.M., Kurt, Ş. and Ekici, Ö.K., 2005. Antagonistic potentials of rhizosphere-associated bacterial isolates against soil-borne diseases of tomato and pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 8: 43-48.
- Soylu, S., Yigitbas, H., Soyly, E.M., Kurt, S., 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia Sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, 103: 1021-1030.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics, structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, 56: 845-857.
- Stirling, A.M., Coates, L.M., Pegg, K.G. and Hayward, A.C., 1995. Isolation and selection of bacteria and yeasts antagonistic to preharvest infection of avocado by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Aust J Agric Res**, 46: 985–995.

- Sturz, A.V., Christie, B.R. and Nowak, J., 2000. Bacterial endophytes, potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 19: 1-30.
- Sülü, S.M., Bozkurt, İ.A., and Soylu, S., 2016. Bitki büyüme düzenleyici ve biyolojik mücadele etmeni olarak bakteriyel endofitler. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 21: 103-111.
- Sun, Y., Cheng, Z., and Glick, B.R., 2009. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **FEMS Microbiology Letters**, 296: 131-136.
- Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C., and Galli-Terasawa, L.V., 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, 4: 26.
- Tabanca, N., Ozek, T., Baser, K.H.C. and Tumen, G., 2004. Comparison of the essential oils of *Origanum majorana* L. and *Origanum x majoricum* Cambess. **Journal of Essential Oil Research**, 16: 248-252.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M., and Graham, J.H., 2000. Compendium of Citrus Diseases, Second Edition. APS Publication, St. Paul, USA. 92 pp.
- Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y., and Shoda, M., 1999. The genes degQ, pps, and lpa-8 (sfp) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43: 2183-2192.
- TÜİK, 2021. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Bitkisel Üretim İstatistikleri, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. Erişim Tarihi:15.05.2022
- Türkmen, M., Kara, M., Maral, H., Soylu, S., 2022. Determination of chemical component of essential oil of *Origanum dubium* plants grown at different altitudes and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Food Processing and Preservation**, 45:xx-xx (in press).
- Ullah, A., Mushtaq, H., Fahad, S., Shah, A. and Chaudhary, H.J., 2017. Plant growth promoting potential of bacterial endophytes in novel association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. **Microbiology**, 86: 119-127.
- Uysal, A., 2019. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Turuncgillerde Antraknoz Etmeni *Colletotrichum* Türlerinin Morfolojik, Patojenik, Moleküler Karakterizasyonu ve Fungisit Duyarlılıkları. **Doktora Tezi, Hatay MustafaKemal Üniv. Fen Bilimleri Enst., Bitki Koruma A.B.D.** 141 sayfa.
- Uysal, A., ve Kurt, Ş., 2018a. An Important Fungal Disease on Citrus Orchards in Erdemli: Anthracnose. **International Erdemli Symposium**, 19-21 April Mersin/Turkey
- Uysal, A., Kurt, Ş., 2018b. *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on pomegranate in Turkey. **Australasian Plant Dis.**, Notes. 13: 19.
- Uysal, A., Kurt, S., 2019a. First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose on citrus in the Mediterranean region of Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 101: 753-753.
- Uysal, A., Kurt, Ş., 2019b. In vitro sensitivity of anthracnose disease agent, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., to some fungicides on lemon. **Bitki Koruma Bülteni**, 59 (1): 53-62.

- Uysal, A., Kurt, S., 2020. First report of fruit and leaf anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* on avocado in Turkey. **Crop Protection**, 133: article number 105145.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, A. and Bashan, Y., 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, 30: 460–468.
- Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y.G., Efferth, T., 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. **Molecules**, 17: 2704-2713.
- Weir, B.S., Johnston, P.R., Damm, U., 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Stud. Mycology**, 73: 115-180.
- Xiao, L., Xie, C.C., Cai, J., Lin, Z.J. and Cheun, Y.H., 2009. Identification and characterization of a chitinase producing *Bacillus* showing significant antifungal activity. **Current Microbiology**, 58: 528.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., Shirata, A., 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, 91: 181-187.
- Yoshida, S., Shirata, A., Hiradate, S., 2002. Ecological characteristics and biological control of mulberry anthracnose. **Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly**, 36: 89-95.
- Zhang, L., Khabbaz, S.E., Wang, A., Li, H., Abbasi, P.A., 2015. Detection and characterization of broad-spectrum antipathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of Fusarium crown and root rot disease of tomato. **Journal of Applied Microbiology**, 118: 685-703.
- Zhao, P., Li, P., Wu, S., Zhou, M., Zhi, R. and Gao, H., 2019. Volatile organic compounds (VOCs) from *Bacillus subtilis* CF-3 reduce anthracnose and elicit active defense responses in harvested litchi fruits. **AMB Express**, 9: 119.
- Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C. and Gu, Y., 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, 101: 292–297.
- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., Li, Y., 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biol. Control**, 65: 200–206.
- Zhou, Y.H., Zhang, L., Zeng, K.F., 2016. Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. **Biological Control**, 96: 39-47
- Zivkovic, S., Stojanovic, S., Ivanovic, Z., Gavrilovic, V., Popovic, T., Balaz, J., 2010. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Archives of Biological Sciences**, 62: 611-623.

EKLER

EK-1. Bakteri ve Fungal etmenlerin geliştirilmesinde kullanılan besi yerleri ve içerikleri

Nutrient (NA) Agar (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:105450)

Pepton	5 g/L
Meat Extract	3 g/L
Agar-Agar	12 g/L

King's MediumB (KB) Agar (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:110989)

Peptone from caseinpepton	10 g/L
Peptone from meat	10 g/L
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	1.5 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g/L
Glyserol	10 ml/L
Agar-Agar	12 g/L

Luria Bertani (LB) Broth (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:110285)

Pepton from casein	10 g/L
Yeast Extract	5 g/L
NaCl	10 g/L

Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:105458)

Pancreatic Digest of Casein	15 g/L
Papaic Digest of Soya Bean	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar-Agar	15 g/L

Patates Dekstroza Agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:110130)

Potato infusion	4 g/L (infusion 200 gr potato)
D(+)-glucose	20 g/l
Agar-Agar	15 g/l